

مقدمة

زرعت لأول مرة أجنة بعض نباتات العائلة الصليبية Crucifera لإنتاج نباتات معملية (Hannig, 1904) ومنذ عام (١٩٢٠) نجحت زراعة نباتات الأوركيد فى المعمل بواسطة البذور والقمم النامية والأنسجة والخلايا والبروتوبلاست والمقوك وحبوب اللقاح والكالس. وحقق (White 1934) نجاحا فى إكثار الطماطم والتبغ بزراعة عقل جذرية على بيئة غذائية. وأثبت (Skoog and Miller (1957 أهمية الأكسينات والسيتوكينينات فى البيئة الغذائية فى تحديد اتجاه وطبيعة نمو الجزء النباتى. وأنتج (Steward, et al. (1958 نباتات من خلايا كالس الجزر. وأحدث (Murshige and Skoog (MS (1962 تطورا عظيما فى تركيب البيئة الغذائية المسجلة باسمهما. وتعتبر الآن بيئة (MS) من أشهر البيئات المستخدمة فى إكثار نباتات ذات الفلقة الواحدة وذات الفلتين وعديد من الأصناف والأنواع النباتية التى كان يصعب إكثارها خضريا. ولذلك تعتبر تقنية زراعة الأنسجة وسيلة للإكثار الخضرى يستخدم فيها أى جزء نباتى مفصول من ورقة أو ساق أو جذر أو زهرة، وقد يكون ذلك الجزء خلية أو نسيجا أو عضوا أو حبوب لقاح أو متوكا أو بيضة. وأثبتت زراعة الأنسجة نجاحا كبيرا فى مجالات البحث العلمى والإنتاج التجارى لنباتات الخضر والفاكهة والزينة والأشجار الخشبية والشجيرات. بينما لم يكن لها نفس النجاح فى إنتاج محاصيل الحقل، وقد يرجع ذلك إلى التغيرات الوراثية غير المرغوبة التى تحدث تلقائيا أثناء نموها على البيئة الغذائية فى المعمل. وبفضل تطبيق تقنية زراعة الأنسجة تم التغلب على ظواهر كثيرة مثل عدم التوافق وموت الأجنة مبكرا والسكون ومواعيد الزراعة والظروف البيئية غير المناسبة. وبدأت التجارب والأبحاث على زراعة الأنسجة النباتية فى مصر فى أوائل السبعينات من القرن العشرين. وفى أوائل الثمانينات أنشئ "مشروع تطوير النظم الزراعية" بمركز البحوث الزراعية- وزارة الزراعة، بهدف إنتاج تجارى للبطاطس والفراولة

والموز خالية من الأمراض الفيروسية وتوفير العملة الأجنبية اللازمة لاستيراد التقاوى ستويا. ثم أضاف المشروع إلى اهتمامه كثيرا من نباتات الخضر والفاكهة والزينة ذات القيمة الاقتصادية. وتحققت نجاحات كثيرة فى مجالات الدراسات الفسيولوجية واستحداث الطفرات وإكثار النباتات ذات القيمة الاقتصادية. وانتشرت معامل زراعة الأنسجة فى الجامعات والمراكز البحثية والقطاع الخاص لمواكبة هذا النشاط والمشاركة فى تغطية الاحتياجات المحلية والتصديرية. وحرصت هيئة الطاقة الذرية على أن تشارك بمجهودها فى هذا المجال، كأحد أنشطتها فى المجال السلمى للطاقة الذرية. فأنشأت شعبة التكنولوجيا الحيوية بالمركز القومى لبحوث وتكنولوجيا الإشعاع. وفى أوائل التسعينات من القرن العشرين كان لتطبيق زراعة الأنسجة واستحداث الطفرات النباتية باستخدام الإشعاع نصيبا من هذا الاهتمام. وهذه المادة العلمية مقدمة لكل المهتمين بمجال زراعة الأنسجة لعلها تسهم فى تحقيق طموحاتهم العلمية ومشاريعهم التجارية، راجيا من الله أن يكون فى ذلك تحقيق لقول رسول الله صلى الله عليه وسلم "إن لله عبادا اختصهم بقضاء حوائج الناس، حبيبهم فى الخير وحبب الخير إليهم، إنهم الآمنون من عذاب الله يوم القيامة" صدقت يارسول الله.

المؤلف

أ.د. محمود توفيق محمد شرباش

شكر وتقدير

يتقدم المؤلف بوافر الشكر والتقدير للدكتورة/ أمينة عبد الحميد على أستاذ مساعد الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية بقسم المنتجات الطبيعية. شعبة التكنولوجيا الحيوية، هيئة الطاقة الذرية، على إخلاصها وحسن تعاونها في إخراج هذا الكتاب.

مع أطيب التمنيات لسيادتها بدوام التوفيق والرقى.

المؤلف

أ.د. محمود توفيق محمد شرياش

الباب الأول

إنشاء معمل زراعة الأنسجة النباتية

التخطيط لإنشاء معمل زراعة الأنسجة

عند التخطيط لإنشاء معمل زراعة الأنسجة يستلزم أن يؤخذ في الاعتبار العناصر الآتية:

- ١- المساحة المخصصة للمعمل.
- ٢- تحديد الهدف من إنشاء المعمل إن كان للبحث العلمى أو للإنتاج التجارى.
- ٣- تحديد مجالات الإنتاج إن كانت شاملة لأنواع كثيرة من النباتات أو متخصصة فى بعض النباتات دون غيرها.
- ٤- تحديد تتابع المعامل والحجرات طبقا لتخصصاتها وارتباطها فى تسلسل خطوات حركة العمل المتوقعة.
- ٥- تحديد متطلبات المعمل من الأجهزة ومستلزمات التشغيل.
- ٦- طريقة توزيع وتثبيت مواقع الأجهزة ومستلزمات التشغيل داخل الحجرات والمعامل المخصصة لها.
- ٧- تحديد متطلبات المعمل من المتخصصين والمشرفين والعمالة وغيرها.

مكونات معمل زراعة الأنسجة

(أ) مكونات إنشائية

- ١- حجرة التحكم فى التيار الكهربائى.
- ٢- حجرة الغسيل والنظافة. وحدة تحضير البيئات الغذائية. وحدة الزراعة العملية (معمل الحقن) وحدة النمو. وحدة الكشف عن الأمراض.

٣- مجموعة حجرات خاصة بأجهزة التعقيم والحضانات والموازين والثلاجات والديب فريزر والفحص المجهرى (ميكروسكوب)، وجهاز قياس الأس الهيدروجينى pH-meter.

٤- مخزن للأدوات بعد غسلها وتعقيمها وحمايتها من إعادة التلوث. ومخزن لمستلزمات التشغيل مثل الأوانى الزجاجية والكيماويات والبيئات المختلفة. ومخزن للكحولات والمذيبات والبيئات سابقة التجهيز.

٥- حجرات خاصة للإداريين والمتخصصين والفنيين المساعدين.

(ب) ملحقات معمل زراعة الأنسجة

(أ) أرض زراعية لزراعة الشتلات فى أصص أو أكياس بلاستيك للوصول بها إلى الحجم المناسب للتسويق.

(ب) صوبة مزودة بأجهزة تحكم فى الإضاءة والحرارة والرطوبة والرى والتهوية، ومحمية من الحشرات والآفات. ومرفق بها مخازن للأدوات والأوانى الزراعية والأسمدة والمبيدات. وللصوبة أهمية كبيرة فى:

١- أقلمة النباتات بعد خروجها من معمل زراعة الأنسجة.

٢- إكثار وتربية نباتات الأم، وهى نباتات تعتبر مصدرا آمنا يفصل منها الأجزاء المطلوبة للزراعة العملية.

مواصفات وحدات معمل زراعة الأنسجة

١- حجرة التحكم فى التيار الكهربائى

هى حجرة تحتوى على اثنين من المولدات الكهربائية، أحدهما أساسى والثانى احتياطى، لضمان توفير تيار كهربائى مستمر بالقدر الكافى للإضاءة وتشغيل الأجهزة، مع توفير أجهزة إنذار عن الأعطال المفاجئة .

٢- حجرة الغسيل Washing room

هى حجرة خاصة لاستقبال العينات النباتية القادمة من الصوبة أو الحقل. ويتم فيها تهذيب العينات النباتية للوصول بها إلى الحجم المناسب للعينه ، ثم غسلها وتنظيفها للتخلص من الأتربة وجميع العوالق. وتتجمع فيها الأدوات المعملية والأوانى الزراعية المستعملة للتخلص من بقايا النباتات والآجار وتنظيفها. ويجب أن تقع هذه الحجرة فى مقدمة معمل زراعة الأنسجة ومنعزلة عنه لشدة تلوثها. ويجب أن يتوفر فيها :

١- مصدر للمياه الباردة والساخنة وأحواض معدنية أو مطلية لا تتأثر بالمنظفات والكيمياويات.

٢- غسالة أطباق لغسل الأوانى والأدوات الأخرى ، ومجموعة من الأرفف الثابتة والمتحركة للتجفيف.

٣- فرن لتجفيف وتعقيم الزجاجات وأدوات التشريح المعدنية بالحرارة الجافة.

٤- جهاز للتعقيم البخارى تحت ضغط (أوتوكلاف).

٥- أجهزة ثنائية التقطير مزودة بأجهزة لإزالة الأيونات ومتصلة بمصدر للمياه الباردة والساخنة.

٦- بعض الدواليب لحفظ الكيماويات اللازمة لغسيل أوانى الزراعة والأدوات المختلفة.

٣- وحدة تحضير البيئات الغذائية

Media preparation unit

هذا المعمل لإعداد وتحضير البيئات وتعقيمها وتخزينها مؤقتا لحين تفريغها فى أوانى الزراعة المعملية مثل الأطباق البترى والدوارق المخروطية والبرطمانات. ويثبت

فى وسط المعمل منصدة عمل ترص عليها أوانى الزراعة المعملية وجهاز توزيع البيئة الغذائية. ويستلزم لهذا المعمل وجود:

١- جهاز ثنائى التقطير مزود بجهاز مزيل للأيونات وأوتوكلاف للتعقيم ومصدر للمياه الباردة والساخنة. ودواليب لتخزين الأوانى الزجاجية والكىماويات اللازمة لتكوين البيئة الغذائية والأدوات المعملية.

٢- بنشات جانبية يثبت عليها بعض الأجهزة مثل ميزان كهربائى حساسية ٠,١ جرام للأوزان الكبيرة نسبيا. وميزان آخر حساس (ملليجرام) للأوزان الدقيقة. وجهاز قياس تركيز أيون الهيدروجين pH-meter. ومقلب مغناطيسى بمسطح ساخن وفرن ميكروويف لإسالة البيئة.

٤- وحدة الزراعة المعملية (حجرة الحقن)

Inoculation room

هى حجرة خاصة للزراعة المعملية. ويجب أن تكون معزولة عن مكونات المعمل. وتتميز بمستوى عال من النظافة والتعقيم، وتحتوى على كابينة الحقن Laminar air-flow cabinet. ويجب أن يتوفر فيها الآتى:

١- أن تكون أرضيتها وجدرانها وما تحتويه من المنافذ والأرفف قابلة للغسيل والتعقيم بالماء والمنعقات.

٢- أن تكون مزودة بجهاز تكييف يعمل ذاتيا إذا ارتفعت الحرارة عن المدى المطلوب.

٣- يثبت بالحجرة لمبات أشعة فوق بنفسجية (UV) للتعقيم، ويثبت واحدة منها فى سقف الحجرة.

الاحتياطات الواجبة فى حجرة الحقن

١- تعتبر أحذية وملابس الزائرين مصدرا هاما للتلوث، لذلك يجب تعطيتهما بغطاء معقم من البلاستيك أو غمس نعلها فى محلول معقم قبل دخول المعمل ولبس بلاط على أن تعقم أرضية الحجرة يوميا.

- ٢- على العاملين بالعمل غسل الأيدي والأجزاء المكشوفة من الأذرع بانتظام بالصابون ثم تعقيمها بكحول ٩٦٪. و يستخدم العاملون بالعمل أحذية وبلاطى- معقمة مقرها الدائم داخل حجرة الحقن.
- ٣- عدم استخدام الكابينة للتخزين أو إدخال مواد ملوثة للمعمل، وعدم إدخال مستخدم الكابينة رأسه داخلها.
- ٤- تغيير الأدوات العملية المستعملة بانتظام ووضعها بعد استعمالها مباشرة فى كحول ٩٦٪. واستبعاد الأوانى المحتوية على بيئات ملوثة بسرعة. وتجمع المخلفات فى أكياس بلاستيك، ويتخلص منها فوراً وبانتظام.

٥- حجرة النمو (وحدة الزراعة)

Growth room (Culture unit)

هى حجرة تنقل إليها الأجزاء النباتية بعد زراعتها فى بيئة غذائية منشطة للنمو وتكوين الأعضاء. وتحتوى هذه الوحدة على منصة لقخص وتتبع نمو المزروعات. وقد يستلزم توفير أكثر من حجرة نمو خصوصا إذا تعددت اهتمامات العمل وامتدت إلى أنواع نباتية أخرى مختلفة فى احتياجاتها الحرارية والضوئية. وحينئذ قد تقسم حجرة النمو إلى وحدات صغيرة بواسطة عوازل محكمة مع وضع مسمى خاص لكل منها مثل:

- ١- حجرة الاستبداء Initiation room: وهى وحدة تنقل إليها الأجزاء النباتية عقب زراعتها مباشرة. وتحضن فى ظلام تام أو ضوء ضعيف ودرجة حرارة مناسبة حتى يكتمل تكوين الكالس.
- ٢- حجرة النمو Growth room: وينقل إليها الكالس بعد تكوينه ويحضن عند درجة حرارة وطول فترة ضوئية وشدة إضاءة مناسبة لتكشف الأعضاء النباتية ونموها.

مستلزمات الإضاءة فى حجرة النمو

- ١- تستخدم لمبات فلورسنت كمصدر ضوئى تتناسب شدته وفقا لكثافة واحتياج المزروعات. ويتم التحكم فى شدة الإضاءة فى بعض الأماكن داخل حجرة التنمية بإضعافها أو حجبيها بالكامل وفقا لاحتياج النباتات .
- ٢- تثبت لمبات الفلورسنت أفقيا تحت الأرفف (فوق النباتات) أو عموديا على جوانب الأرفف لانتظام توزيع الإضاءة بين النباتات وتجنب ارتفاع الحرارة فى الأماكن القريبة من اللمبات.
- ٣- الترنسات الخاصة بلمبات الفلورسنت تعتبر مصدرا لانبعاث الحرارة، لذلك يفضل تثبيتها خارج حجرة النمو.
- ٤- توفير جهاز توقيت لضبط توالى عدد ساعات الإضاءة والظلام طبقا لحاجة النباتات.
- ٥- توفير جهاز لقياس شدة الإضاءة Lux-meter. وجهاز إنذار عن الأعطال المفاجئة فى التيار الكهربائى.

تثبيت الحرارة فى حجرة النمو

- ١- يثبت جهاز تكييف مركزى للتحكم الكامل فى درجات الحرارة داخل جميع وحدات معمل زراعة الأنسجة، وضبطها عند ٢٧-١٧°م. لذلك يفضل تركيب جهاز تكييف احتياطى داخل كل وحدة من وحدات المعمل للتشغيل إذا حدث عطل مفاجئ لجهاز التكييف المركزى.
- ٢- توفير جهاز إنذار للتنبيه عن الأعطال أو الخلل المفاجئ فى جهاز التكييف المركزى.
- ٣- ضرورة التأكد من التهوية الجيدة بين الأرفف الحاملة للأوانى المزروعة حتى لا ترتفع الحرارة بينها. ويفضل استخدام أرفف معدنية مفتحة مع المحافظة على زيادة حركة الهواء داخل الحجرة وبين الأرفف.

٤- تثبيت جهاز أمان بكل حجرة يقوم بفصل الإضاءة إذا كانت هي السبب في ارتفاع الحرارة.

٦- وحدة الكشف عن الأمراض

هي وحدة خاصة للكشف عن الأمراض الفيروسية والبكتيرية والإصابات الحشرية والنيماطودا التي تصيب النباتات. ويجب أن تكون هذه الوحدة معزولة عن الحجرات السابقة. ويثبت فيها بنشات يوضع عليها أجهزة الكشف عن الفيروسات مثل جهاز ELISA أو جهاز IC-PCR و بينوكلر وميكروسكوب. كما يجب أن يتوفر فيها الأطباق البترى والأدوات المعملية والكيماويات اللازمة للاختبارات الميكروبية.

احتياجات معمل زراعة الأنسجة النباتية

١- أجهزة ومعدات

- كابينة تيار هواء مستمر (كابينة للحقن) Laminar air-flow cabinet
- حضانات عادية Incubators وحضانات هزازة Shaking incubators
- حضانة بمسطح دائري الاهتزاز Platform - shaker incubator
- أجهزة تعقيم بالضغط البخارى Autoclaves
- أفران تجفيف Ovens مختلفة الأحجام للتجفيف والتعقيم.
- فرن ميكروويف Microwave لتسخين وإسالة البيئة الغذائية والآجار والعينات المجمدة.
- جهاز تبريد عميق (-٢٠°) Deep freezer.
- ثلاجات عادية لتخزين البيئات الغذائية والمواد الكيميائية مثل الهرمونات والفيتامينات.
- جهاز ثنائي التقطير مزود بجهاز مزيل للأيونات Deionizer Bi-distiller

- جهاز طرد مركزي بطيء السرعة Low speed Centrifuge
- جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH-meter
- حمامات مائية مختلفة الأحجام.
- غسالة أطباق ذاتية التشغيل Dishwasher وغسالة ماصات مقاومة للأحماض
- Pipette washer.
- مقلب مغناطيسي عادي Magnetic stirrer ومقلب مغناطيسي بمسطح ساخن.
- موازين عادية ذات حساسية ٠,٠١ جرام و ذات حساسية ٠,٠١ ملليجرام.
- موزع للعينات ذاتي التشغيل Automatic dispenser
- خلاط للعينات الكبيرة Blender
- ميكروسكوب استريو Stereo- microscope
- جهاز توقيت Timer لضبط وقت التعقيم.

مستلزمات تشغيل

- مواد كيميائية داخلية في تكوين البيئة الغذائية من أملاح معدنية ومنظمات النمو وآجار ومنظمات للنمو.
- بيئات غذائية مختلفة جاهزة التركيب.
- مواد معقمة مثل هيبوكلوريت الصوديوم وهيبوكلوريت الكالسيوم وكحول إيثانول ٩٦٪.
- خطوط لإمداد الغاز والماء والهواء المضغوط وخطوط لتفريغ الهواء ومصدر للبخار
- Steamer وخطوط كهرباء في جميع المعامل وكابينة الحقن.
- نظام مرشح دقيق Millipore filter system
- حاويات معدنية للأطباق البترى والمصاصات تستخدم أثناء تعقيمها في جهاز الضغط البخاري.

- أدوات زجاجية وبلاستيكية عيارية وغير عيارية مثل المخابير ودوارق مخروطية ودوارق ستيوارد Steward flask وكثوس ومصاصات وسحاحات وأنابيب اختبار مختلفة الأحجام ويفضل أحيانا أنابيب بغطاء قلاووظ Screw-top ، وأطباق بترى Petri dishes وزجاجات لبن وبرطمانات مرسى وزجاجات حفظ ومجفقات Desiccator وخزان للماء المقطر والماء الخالى من الأيونات.

مستلزمات الغسيل والنظافة

- حوض غسيل مضاد للأحماض وتروالى لتقل المعدات .
- أدوات نظافة مثل القوط والفرش. ومواد تنظيف الأدوات الملوثة مثل حمض الكبريتيك والكروميك ومطهرات.
- حوامل معلقة لتجفيف الأدوات المعملية مثل الدوارق والبرطمانات بعد غسلها.
- سدادات قطن وورق ألومنيوم وأفلام بلاستيك وأغطية أنابيب معدنية لغلق الأنابيب.

- ورق ألومنيوم Aluminum foil وورق ترشيح Filter papers وفيتا فيلم Vita film أو ما يماثله للف وتغطية الصناديق والحوامل وغيرها.
تستخدم فى المعامل التجارية لزراعة الأنسجة أدوات ومستلزمات خاصة بالتكاثر مصنوعة من البلاستيك لانخفاض سعرها وسهولة تداولها. ويؤخذ فى الاعتبار أن أنابيب الاختبار حجمها أكبر ومسطح البيئة داخلها أصغر ولكن التهوية داخلها منخفضة وهذا يقلل من تعرض البيئة للجفاف والتلوث. بينما الأطباق البترى لها حجم أصغر نسبيا ومسطح أكبر وتهوية أفضل مما يعرض البيئة بها لسرعة الجفاف والتلوث. لذلك يفضل إحكام غلق الأطباق البترى بشرائط من الباراك فيلم أو ما يماثلها. والدوارق الكبيرة أفضل للنمو من الدوارق الصغيرة، حيث تزداد فيها كمية البيئة الغذائية المستخدمة فى وحدة المساحة مما يؤدى إلى انخفاض تجمع غازات ثانى أكسيد الكربون والإيثلين حول الأجزاء النباتية المزروعة.

الباب الثانى

التعقيم Sterilization

يجب المحافظة على نظافة وتعقيم معمل زراعة الأنسجة وخاصة حجرة الحقن ومعمل النمو. لأن التلوث يعنى فساد المزروعات وضياع الوقت والمجهود وفقدًا للكيمواويات.

مصادر تلوث معمل زراعة الأنسجة

- ١- تلوث المواد الكيميائية الداخلة فى تركيب البيئة والأدوات المستخدمة فى تداولها، لذلك يجب تخصيص أدوات محددة لكل مادة كيميائية لمنع انتقال التلوث من مادة كيميائية إلى أخرى.
 - ٢- عدم نظافة وتعقيم الأدوات المستعملة وعدم نظافة وتعقيم الأرضيات وعدم إزالة المخلفات بسرعة من المعمل وعدم اهتمام العاملين بالنظافة الشخصية.
 - ٣- النوافذ والأبواب غير محكمة الغلق التى تسمح بدخول الأتربة إلى المعمل هى من المصادر الهامة للتلوث.
- ويجب أن يتوفر فى المعمل دقة التصميم الهندسى لمنع نقاذ الأتربة إلى داخله.

١- تعقيم حجرة الحقن

Sterilization of inoculation room

- ١- تنظف منضدة الكابينة بالكحول ٩٦٪، ولا يستخدم كحول ٧٠٪ حتى لا تترك قطرات من الماء بعد تطاير الكحول وتصبح مصدرا للتلوث. ثم تجفف الكابينة بقطعة من القماش الجيد الذى لا يترك أية بقايا.

- ٢- يفضل تشغيل الكابينة لمدة ١٥ دقيقة قبل بدء العمل للتأكد من سلامتها.
- ٣- تترك أحيانا لمبات الأشعة فوق البنفسجية (UV) مضاءة طوال الليل لتعقيم حجرة الحقن ومحتوياتها قبل استخدامها في اليوم التالي، وقد يفضل إضاءتها قبل بدء العمل بفترة لا تقل ولا تزيد عن ٣٠ دقيقة مع التأكد من غلق الأبواب بإحكام. ويجب عدم النظر إليها أثناء تشغيلها لحماية العين من الأضرار.

كابينة تيار الهواء المعقم Laminar flow hood

يتم في هذه الكابينة فصل الأجزاء النباتية وزراعتها في أوعية الزراعة المعملية. ويجب أن يتوفر فيها التعقيم التام أثناء إجراء الزراعة. وتتميز هذه الكابينة بقدرتها على تنقية وتعقيم الهواء المار بداخلها. حيث يمر الهواء الجوى بضغط ثابت خلال مرشحات أقل من ميكرون لمنع مرور ذرات التراب وما تحمله من كائنات دقيقة، ثم يمر الهواء داخل الكابينة بعد أن يصبح على درجة عالية من النقاوة والتعقيم. ويجب تغيير الفلتر بآخر جديد سنوياً. ويثبت في سقف الكابينة لمبات فلوروسنت كمصدر للإضاءة. ويتوفر في الكابينة مصدر غاز يستخدم كلهب لتعقيم الأدوات المستخدمة في الزراعة والحقن أو يستخدم بدلاً منه مصباح كحول.

٢- نظافة وتعقيم الأدوات المعملية

١- نظافة الأدوات الزجاجية

تنظف الأوعية الزجاجية والأدوات المعملية في حجرة الغسيل. وتنظف الزجاجيات الجديد منها الذي لم يسبق استعماله في إناء يحتوى على خليط من حمض الكروميك وحمض الكبريتيك أو منظف صناعي. ثم تغسل تحت تيار ماء جار لفترة لا تقل عن ٥ دقائق يعقبها غسيل بماء مقطر معقم مرتين متتاليتين، ثم تحفظ جديعها بعيداً عن الأتربة. ويعاد غسلها مرتين بالماء المقطر قبل استخدامها إذا خزنت لفترة طويلة. فإذا تلوثت الأرضية بمخلوط الحامضين المذكورين أو

كليهما فتتظف باستخدام مصدر مائي ذى ضغط عالٍ. لذلك يجب أن تكون أرضية العمل مقاومة للأحماض. ويجب استعمال قفازات وبلاط مقاومة للأحماض. وتنظف الزجاجيات المستعملة بسرعة قبل جفاف الآجار والتصاقه بجدار الوعاء. ويبدأ تنظيف الأنابيب بإزالة السدادات ثم توضع فى ماء ساخن. ويستخدم ملقاط وفرشاة مناسبة للتخلص من الآجار وبقايا النباتات الموجودة فى الأنابيب. ويفضل استخدام غسالة أطباق لغسل الأواني الزجاجية، ثم تشطف بماء مقطر خالٍ من الأيونات، ثم تجفف جيدا فى فرن تجفيف بعد التأكد من نظافتها، ثم تخزن بسرعة بقدر الإمكان لتقليل فرصة تلوثها.

٢ - تعقيم الأدوات المعملية

الأدوات المعملية تشمل جميع الأواني الزجاجية والبلاستيكية المستخدمة فى الزراعة والأدوات الأخرى مثل السكاكين والمشارط والملاقط والمقصات وغيرها. ويتم التعقيم بأشعة جاما أو بالضغط البخارى باستخدام الأوتوكلاف أو بالحرارة الجافة. ولا تستخدم الأوعية البلاستيكية منخفضة الجودة إلا مرة واحدة لأنها لا تتحمل حرارة التعقيم المرتفعة، ولها عمر افتراضى تصبح بعده غير صالحة للاستعمال. ويستخدم الإشعاع بنجاح فى تعقيم الأدوات المعدنية والأواني الزجاجية والبلاستيكية بصرف النظر عن جودتها. ويفضل استخدام الأوتوكلاف أو أفران الحرارة الجافة فى تعقيم الأواني الزجاجية. والأواني البلاستيكية التى تتحمل حرارة التعقيم عادة مرتفعة الثمن وتعقم مثل الزجاجيات ولها بعض المشاكل مثل انبعاث الإيثيلين منها، وهو مركب ضار للبيئة وسام للنباتات. وتعقم الأدوات الزجاجية بالحرارة الجافة فى فرن حرارته ١٥٠°م لمدة ساعة واحدة، على أن تكون من الزجاج المقاوم للحرارة مثل Pyrex أو بوروسيليكاتات Borosilicate وهى مرتفعة الثمن، والأنواع الرخيصة منها لا تتحمل الحرارة المرتفعة، وينفرد منها كاثيونات سامة مثل الصوديوم والرصاص والزئبق إلى البيئة الغذائية. ويستخدم الزجاج البيركس بصفة خاصة لزراعة البروتوبلاست والخلايا الفردية والأنسجة المرستيمية. ويجب الأخذ فى الاعتبار ما يلى:

١- تغلف الأدوات المعملية مثل السكاكين والمشارط والملاقط والمقصات وغيرها بورق ألومنيوم قبل تعقيمها في الأوتوكلاف ، وتظل مغلقة بعد تعقيمها للحفاظ عليها معقمة حتى وقت استعمالها. وتوضع الماصات والحقن داخل علب خاصة بها ثم تغلف كل علبة بورق ألومنيوم للمحافظة عليها بعد التعقيم.

٢- عند الزراعة المعملية يغمس طرف الآلة المستخدمة في كحول، ثم تعرض إلى لهب من مصباح بنز ثم يوضع في ماء معقم ليبرد. ويجب عدم وضع أية أداة في كحول بعد تعرضها مباشرة لصدر حرارى حتى لا يحدث انفجار أو التهاب للكحول و قد يؤذى القائم بالزراعة المعملية.

٣- يجب عدم ملاسة الأدوات المعملية سطح البيئة الغذائية عند نقل وزراعة الجزء، أو النسيج النباتى.

٤- يفضل استخدام ماصات Pipettes أو سرنجات Syringes معقمة لضمان عدم تلوث البيئة الغذائية. وتخصص واحدة منها جديدة ومعقمة لكل نوع من المحاليل المستخدمة.

٥- يجب تغطية الشعر تماما ووضع كمامة فوق الأنف والقم. وتطهير الأيدي وأى جزء آخر مكشوف من الذراع بالكحول حتى لا يكون مصدرا لتلوث البيئات الغذائية والأجزاء النباتية.

٣- تعقيم البيئة الغذائية

Sterilization of nutritional medium

يجب التأكد من نقاوة وتعقيم المركبات الداخلة في تكوين البيئة ومنع تلوثها. ويفضل تحضيرها قبل الاستعمال مباشرة، ويجب ألا تزيد فترة تخزينها عن ١٤ يوما.

١- التعقيم بالأوتوكلاف

تعقم معظم البيئات الغذائية فى الأوتوكلاف ، وهو جهاز تعقيم بخارى تحت ضغط يتميز بسرعة وسهولة التشغيل. ويختلف الأوتوكلاف فى شكله وحجمه فمنه

الأقصى الذى يتم تحميله من الأمام، والرأسى الذى يتم تحميله من أعلى. والنوع الأفقى أسهل استعمالاً وأعلى سعراً. وتصل حرارة التعقيم ١١٥ - ١٣٥°م. لذلك فالأوتوكلاف قادر على تحطيم جميع الكائنات الدقيقة والفيروسات. وتعتمد كفاءة التعقيم على مدة التشغيل والضغط البخارى المستعمل ودرجة الحرارة وحجم المواد المطلوب تعقيمها. ويحتاج تعقيم الأحجام الكبيرة من البيئة الغذائية الموجودة فى عبوة واحدة إلى فترة زمنية أطول لضمان تجانس توزيع حرارة التعقيم (جدول ١) كذلك تحتاج إلى فترة أطول بعد تعقيمها لكى تفقد حرارتها المرتفعة. وقد يؤدى إطالة فترة التعقيم أو فترة ما بعد التعقيم إلى تلف البيئة أو احتراق بعض مكوناتها مثل السكر. لذلك يفضل توزيع البيئة على أنابيب أو دوارق بمعدل ٢٠ - ١٠٠ مللى لكل منها لضمان اكتمال وتجانس التعقيم وحماية مكوناتها من التغيير. ويتم التعقيم بعد ١٥ - ٢٠ دقيقة عند ١٢١°م وضغط بخارى واحد كيلوجرام/سم^٢. وتغلق أنابيب الاختبار أو الدوارق الزجاجية المحتوية على بيئة غذائية قبل وضعها فى الأوتوكلاف بسدادة من القطن محاطة بطبقة من الشاش للمحافظة على تعقيمها بعد التعقيم. وقد تستخدم أغذية مخصصة للأنابيب والدوارق الزجاجية على أن تكون غير محكمة الغلق لتساعد على تمدد الهواء داخلها ومنع انفجارها داخل الأوتوكلاف. وقد تستخدم أغذية تحتوى على نتوءات داخلية تلامس السطح الخارجى للأنبوبة الزجاجية وتسمح بتبادل الغازات. ويستخدم أيضاً قطع مربعة مناسبة من ورق الألومنيوم سمك ٠,٢٥ ملليمتر، حيث توضع قطعة ورق الألومنيوم فوق فوهة الأنبوبة أو الدورق ثم تطوى أطرافها برفق حول محيط العنق، ويؤدى إحكام غلق الأوعية إلى عزل محتواها عن المحيط الخارجى وخلق ظروف لا هوائية داخلها. ويتميز غطاء الألومنيوم بإمكان رفعه وإعادة تعقيمه واستعماله لإضافة مادة كيميائية أو جزء نباتى. ويمكن استخدام غشاء من البولييثين polythene بعد تعقيمه فى ٧٠٪ كحول إيثايل بدلاً من ورق الألومنيوم.

ويتوفر فى الأسواق أجهزة لتحضير وتعقيم كميات ما بين ١٠,٥ - ١٦ لتراً. ويتم تعقيمها تحت ضغط بخارى. ويتم خلط البيئة مع التقليل أثناء التعقيم لضمان

الخلط الجيد وإذابة جميع مكوناتها وسرعة التسخين وتجانس الحرارة في البيئة. وبعد التعقيم تبرد البيئة بسرعة تحت تيار ماء جار. ثم تضاف المكونات التي تتحمل الحرارة أولاً مع التقليب. بعدها تصبح البيئة معقمة صالحة للتوزيع في أواني الزراعة.

جدول (١) مدة التعقيم بالأتوكلاف عند درجة حرارة ١٢١°م

حجم البيئة الغذائية (مللى) ^٢	الوقت اللازم للتعقيم (دقيقة)
٢٠ - ٢٥	١٥
٢٥ - ٥٠	٢٠
٥٠ - ٥٠٠	٢٥
٥٠٠ - ١٠٠٠	٣٠
١٥٠٠	٣٥
٢٠٠٠	٤٠

سليبات التعقيم بالأتوكلاف

(أ) حدوث تحلل مائي للسكروز إلى فركتوز وجلوكوز وسكريات وأحماض سكرية. وارتفاع حرارة التعقيم أكثر من اللازم قد يؤدي إلى كرملة السكر.

(ب) حدوث تغيير في رقم حموضة البيئة الغذائية (pH) بمقدار ٠,٥-٠,٣ وحدة، مما يسبب انفصالاً لبعض مكوناتها وحدث بعض التفاعلات الجانبية بينها وانخفاض فاعليتها.

(ج) حدوث تحطيم لبعض المركبات الداخلة في تكوين البيئة مثل الكولثيسين والزياتين Zeatin والجبريلين وفيتامين (B) Thiazol و Pyrimidine وفيتامين B (Partothenic) Vitamin C والمضادات الحيوية والإيثريل Ethrel والإيثلين Ethylene .

٢- التعقيم بالمرشحات Sterilization by filtration

يستخدم للتعقيم مرشحات خاصة مثل Millipore MF filters ذات مسامية ٠,٢٢ ميكرومتر للتخلص من جميع الجسيمات العالقة والكائنات الدقيقة، حيث تمرر المحاليل والبيئات السائلة وغيرها خلال أغشية الفلتر.

وتستخدم هذه الطريقة بدلا من التعقيم بالضغط البخارى (الأوتوكلاف). والتعقيم بالترشيح يؤدي إلى احتفاظ البيئة بمكوناتها الغذائية بدون تغيير ويؤخذ عليه ادمصاص بعض المركبات على سطح الفلتر، ولذلك يفضل استبعاد الكمية الأولى من الراشح لاحتمال عدم مطابقته للمواصفات المطلوبة، كما أن بعض الفيروسات قد تكون صغيرة ولها القدرة على المرور خلال الفلتر.

٤- تعقيم الأجزاء النباتية Sterilization of explants

الأجزاء النباتية المفصولة من نباتات نامية فى الحقل عادة تكون ملوثة بأنواع مختلفة من الكائنات الدقيقة. ويعتبر الهواء والأتربة ومياه الري والآفات وغيرها أهم مصادر للتلوث. وزراعة الأجزاء النباتية الملوثة يؤثر تأثيرا سيئا على نمو وتطور النموات. لذلك فتعقيم الأجزاء النباتية القادمة من الحقل شرط أساسى.

خطوات التعقيم

١- يغسل الجزء النباتى تحت تيار مستمر من ماء الصنبور لمدة ١-٢ ساعة لتنظيف سطحه الخارجى جيدا والتخلص من الأتربة العالقة عليه وتخفيض الحمل الميكروبي.

٢- يغمس الجزء النباتى فى محلول التعقيم للقضاء على ما تبقى من الأحياء العالقة على سطحه. واختيار المادة الكيميائية المعقمة والفترة الزمنية المناسبة للتعقيم يعتمد على حساسية الجزء النباتى المراد تعقيقه. ويؤدي التعقيم الشديد إلى التخلص من الكائنات الدقيقة المنتشرة على السطح الخارجى. وقد يؤدي أيضا إلى تدمير بعض

الأنسجة الخارجية للجزء النباتي. لذلك يجب اختيار مادة التعقيم والفترة المناسبة للتعقيم بدقة.

٣- يغسل الجزء النباتي بالماء المقطر المعقم عدة مرات للتخلص من الآثار المتبقية من مادة التعقيم. مع الاهتمام بإزالة جميع الأنسجة المتضررة والتالفة من تأثير مادة التعقيم.

٤- يقطع الجزء النباتي إلى أحجام مناسبة للزراعة المعملية تحت ظروف معقمة، ويستخدم في ذلك أدوات معقمة جيدا. ثم تزرع الأجزاء النباتية تحت ظروف تعقيم في أواني الزراعة مثل أنابيب الاختبار ودوارق مخروطية وأطباق بترى تحتوى على بيئة غذائية. ويراعى أن تكون الأواني والبيئة الغذائية معقمة جيدا.

تعقيم الأجزاء النباتية بالكيمائيات Chemical sterilization

تعقم الأجزاء النباتية سطحيا باستخدام مركبات مثل هيبوكلوريت الصوديوم (NaClO) وهيبوكلوريت الكالسيوم وماء البرومين وفوق أكسيد الإيدروجين ونترات الفضة وكلوريد الزئبق وكحول الإيثايل وأكسيد الإيثيلين. ويفضل إضافة ٠,٥٪ من مادة ناشرة مثل Teepol; Trigetol; Tween-20 إلى محلول التعقيم لتسهيل انتشاره على الأسطح الخارجية للأجزاء النباتية وزيادة كفاءته فى قتل الكائنات الدقيقة. ويستخدم هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز ١٪ بنجاح فى التعقيم لانخفاض أضراره الجانبية. حيث يتحلل هيبوكلوريت الصوديوم إلى كلورين ذات الأثر الفعال فى التعقيم، ويتفاعل الصوديوم مع الماء ليكون هيدروكسيد الصوديوم، وهو مركب سهل التخلص منه بالماء. ويحتاج التعقيم من ٥ إلى ٣٠ دقيقة فى محلول ١٪ هيبوكلوريت الصوديوم. وإطالة فترة التعقيم قد يكون لها تأثير ضار على الجزء النباتي. وقد يستلزم تغطية الأسطح المجروحة على الجزء النباتي بالبرافين لمنع نفاذ محلول التعقيم إلى الأنسجة الداخلية ومنع خروج السائل الخلوى. ويستخدم البرومين بتركيز ١٪ لتعقيم البذور قبل زراعتها مباشرة. ويسبب البرومين بعض الأضرار للجنين إذا كان غلاف البذرة رقيقا. ويستخدم فوق أكسيد الإيدروجين (H_2O_2)

فى التعقيم ، وهو سهل التحلل إلى أكسيجين وماء ، وهى شقوق غير ضارة وتتبخّر بسهولة . ويسبب هذا المركب بعض الأضرار حيث يفقد النسيج النباتى بعضاً من رطوبته أو يؤدى إلى جفافه . ومحلول كلوريد الزئبق المخفف يعقم الأنسجة النباتية بنجاح ، خصوصاً الأجزاء النباتية المغطاة بطبقة كيوتين أو ذات أسطح غير مستوية . ويؤخذ عليه صعوبة إزالة آثاره المتبقية على الجزء النباتى بالماء . ويمكن إزالته بكحول إيثايل أو مسحوق غسيل أو خليط بينهما . لذلك يجب تحديد فترة التعقيم وتركيز مادة التعقيم المستخدمة لكل نوع نباتى (جدول ٢ ، ٣) .

جدول (٢) الفترة الزمنية (الدقيقة) والتركيز المناسب
من مادة هيبوكلوريت الصوديوم

الجزء النباتى	النبات	مدة التعقيم	هيبوكلوريت الصوديوم %
أوراق	Anthurium andreaum	30	1
نسيج	Hyacinthus scale	15	1
سوق	Rhododendron	20	1
أزهار	Gerbera	15	1
براعم زهرية	Freesia	20	1
أوراق	Strelitzia	45	1
بذور	Tulipa	30	2
سوق	Phaseolus	15	1
قمم السوق	Nephrolepis	5	1

جدول (٣) بعض المواد المستخدمة فى تعقيم الأجزاء النباتية

سهولة الإزالة	التأثير	مدة التعقيم (دقيقة)	التركيز %	مادة التعقيم
+++	جيد جدا	30 - 5	10 - 9	هيبوكلوريت الكالسيوم
+++	جيد جدا	30 - 5	2	هيبوكلوريت الصوديوم
+++	جيد جدا	2 - 10	2 - 1	ماء البرومين
+++++	جيد	15 - 5	12 - 10	فوق أكسيد الأيدروجين
+	جيد	30 - 5	1	نترات الفضة
+	مقبول	10 - 2	1 - 0.1	كلوريد الزئبق
++	جيد بوجه عام	60 - 30	5 - 4 ملليجرام / لتر	مضادات حيوية

• التدرج من صعب الإزالة (+) إلى سهل الإزالة جدا (+++++).

• ٢٠ % حجم/حجم من المحلول التجارى.

مواصفات مواد التعقيم

يجب أن تتوفر فى مواد التعقيم سهولة التخلص من آثارها بالشطف فى الماء. وأن تكون غير قابلة للتفاعل مع مكونات النسيج النباتى حتى لا تتكون مركبات لها تأثير ضار على النموات الجديدة. ويجب أن تتحلل بسهولة إلى مكونات أقل سمية من المادة الأصلية وسهولة التخلص منها بالماء. وأثناء تعقيم الأجزاء النباتية

قد يظهر عليها لون بني نتيجة تكوين صبغة الميلانين. ويمكن منع هذه العملية بغمس الأجزاء النباتية في محلول حمض أسكوربيك تركيز ١٠٠ ملليجرام/ لتر، ثم غمسها في حمض الستريك تركيز ١٥٠ ملليجرام/ لتر.

التلوث الذاتى للأجزاء النباتية

يظهر أحيانا نموات للكائنات الدقيقة فى بعض الأواني المحتوية على مزروعات. وقد يرجع ذلك إلى رداءة التعقيم. وقد يكون مصدر التلوث هى الأنسجة الداخلية للجزء النباتى نفسه التى يصعب على مواد التعقيم الوصول إليها. وتظهر النموات الميكروبية إذا تلامست الأسطح المجروحة على الجزء النباتى للبيئة الغذائية. وتظهر النموات المصابة ضعيفة وشاحبة وتموت، و يجب التخلص من هذه الأواني فورا. وتساعد البيئة الغذائية الغنية على زيادة انتشار الإصابة الميكروبية. وقد تحدث طفرات ميكروبية قادرة على النمو على البيئة الفقيرة. وقد تكون القمة النامية للساق مصدرا للتلوث لصعوبة تخلل مواد التعقيم بين الأوراق المتجمعة والملاصقة لها. لذلك تعقم القمة النامية على مراحل متتالية تبدأ بغسلها جيدا بالماء ثم تعقم ظامريا، ثم تزال بعض الأوراق وتعقم مرة ثانية. ويكرر التعقيم بعد كل إزالة لبعض الأوراق. ويفضل أحيانا إجراء اختبار لتقدير كفاءة التعقيم. حيث تحضر بيئة يضاف إليها ٢-٣٪ تريبتون Tryptone أو بيبتون Peptone. ثم تزرع عليها أجزاء من الطرف القمى لأحد الأفرع بعد قطعها طوليا ويكون السطح المجروح ملاصقا للبيئة. وبعد أيام قليلة تظهر بوضوح نموات للكائنات الدقيقة إن وجدت. ونتائج هذه الطريقة غير مشجعة دائما حيث لا توجد بيئة غذائية قياسية يمكن استخدامها كدليل جيد لكل أنواع البكتيريا التى تنمو داخل الأنسجة النباتية. ويساعد على ظهور التلوث الذاتى مايلى:

١- عدم غسل وتعقيم الأيدي. وعدم استخدام أقنعة للغم والأنف وأغطية للشعر وقفازات معقمة. وعدم استخدام بلاط معقمة. وعدم السماح بدخول أعداد كبيرة من

الزائرين داخل حجرة الحقن. والتعقيم الرديء لكابينة الحقن. وعدم تغطية الأحذية بغطاء بلاستيك أو غمس نعل الحذاء فى محلول معقم عند دخول حجرة الحقن. لذلك يجب التأكد من سلامة وتعقيم حجرة الزراعة وكابينة الحقن بدفع هواء معقم داخل الكابينة والتشعيع بأشعة (UV) أثناء الليل وتجديد الفلاتر الأمامية للكابينة سنوياً.

٢- عدم تعقيم منضدة العمل بكحول إيثانول ٩٦٪. وعدم تعقيم الأرضيات. والتعقيم الرديء للأدوات المستخدمة.

٣- قد تكون الأسطح الخارجية للأنايبب والدوارق المخروطية غير معقمة جيداً، لذلك يفضل تعقيمها ثم تخزينها فى ظروف معقمة حتى ولو كانت محتوية على بيئة غذائية.

٥- وجود بعض الكائنات الحية مثل العناكب، حيث إن لها القدرة على النفاذ بسهولة خلال الأغشية القطنية وشرائط البلاستيك حاملة معها الكائنات الدقيقة إلى البيئة الغذائية فى الأنايبب والدوارق.

طرق التغلب على التلوث الذاتى

١- زراعة الطرف المرستيمى Meristemic tip

يفضل استخدام القمة المرستيمية المحاطة بواحدة أو اثنين من منشئات الأوراق لخلوها من الفيروس. وقد يرجع ذلك إلى عدم اكتمال تكوين الأوعية الناقلة فى القمة المرستيمية . ويفصل المرستيم من القمة النامية المعقمة، وقد لا يستلزم تعقيمها إذا كانت مفصولة من نباتات معملية أو مربية فى صوبة.

٢- إضافة مضادات حيوية للبيئة الغذائية

تضاف أحياناً بعض المضادات الحيوية للبيئة الغذائية مثل: Benomyl ; Benolate بتركيز ١٠ ملليجرام/ لتر لإيقاف نشاط الكائنات الدقيقة، وقد يسبب المركب Benomyl بعض الأضرار لنمو الأجزاء النباتية وتطورها. لذلك لا يفضل البعض

إضافة مثل هذه المركبات للبيئة لاحتمال تفاعلها مع مكونات البيئة الغذائية وتكوين مركبات سامة للنموات، وقد يكون لها ضرر مباشر للريوسومات مما يؤدي إلى تثبيط النمو. وقد تظهر طفرات في الكائنات الدقيقة مقاومة للمضادات الحيوية، كما أن المضادات الحيوية ليس لها تأثير على الفيروسات. ومن المركبات المستعملة :

Oxytetracycline; Tetracyclin; Penicilin – G; Streptomycin; Rifampicin;
Achromycin; Chloromycin; Gentamycin; 8-Hydroxy – quinoline



الباب الثالث

زراعة الأنسجة النباتية

تتكاثر النباتات بطريقتين، الأولى وهي طريقة جنسية Sexual وتستخدم فيها البذور. وهي طريقة شائعة في محاصيل كثيرة. ويؤدي التكاثر بالبذور إلى إنتاج نباتات مختلفة في صفاتها عن الآباء. وتزداد الاختلافات بارتفاع نسبة التلقيح الخلطي. والطريقة الثانية هي التكاثر الخضري اللاجنسى Asexual. وهي طريقة تقليدية تستخدم فيها أى جزء آخر خلاف البذور مثل الخلفات والفسائل والعقل والأبصال والدرنات والكورمات وغيرها. ويستخدم التكاثر الخضري في إكثار كثير من محاصيل الفاكهة ونباتات الزينة وأشجار وشجيرات وبعض نباتات الخضر وبعض محاصيل الحقل. ويؤدي التكاثر الخضري إلى تكوين نباتات متجانسة ومشابهة لنبات الأم.

الكفاءة الذاتية للخلية النباتية Cellular totipotency

تطبق زراعة الأنسجة انطلاقاً من الحقيقة العلمية بأن للخلية النباتية قدرة ذاتية على الانقسام والتناسخ والنمو وإنتاج نبات كامل له نفس مواصفات نبات الأم، بصرف النظر عن مصدرها من النبات، وهذا ما يسمى بالجهد الذاتى وتحتوى الخلية النباتية الحية على نسخة كاملة من الجينات الموجودة فى أى خلية جسمية أخرى من خلايا نبات الأم. وجميع هذه الجينات ساكنة غير معبرة Unexpressed (Turned-off) ماعدا بعض الجينات المعبرة عن نشاطها فى العضو النباتى الموجودة فيه. لذلك يمكن فصل خلية أو نسيج أو جزء من أى عضو نباتى ثم تزرع على بيئة غذائية مناسبة فتنمو وتنتج نباتا كاملا. كما تتميز أية خلية بوجودها تحت تأثير ما يعرف بالتأثير الوضعى Position effect. فالخلية اللحائية لا يمكن أن تتحول

إلى خلية برانشيمية بمحض إرادتها طالما لم تتعرض إلى ما يجبرها على تغيير تخصصها أو إلغائه. ويعنى ذلك أن الخلية النباتية وهى مازالت ضمن نسيج نباتى معين لا يظهر لها إلا وظيفة فسيولوجية محددة ، ويعرف هذا بالتأثير الوضعى Position effect. فإذا فصلت خلية حية نشطة فسيولوجيا من النسيج وأصبحت حرة بعيدة عن التأثير الوضعى السابق وزرعت فى بيئة غذائية مناسبة فإنها تنشط وتقوم بجميع العمليات الحيوية وتنتج نباتا جديدا بصرف النظر عن مصدر هذه الخلية. وخاصية الجهد الذاتى تميزت بها الخلية النباتية فقط. فلا يمكن فصل خلية حيوانية أو نسيج حيوانى وزراعته فى بيئة غذائية داخل المعمل لإنتاج حيوان كامل كما يحدث فى النبات. ومن هنا كان الاهتمام بتطبيق تقنية زراعة الأنسجة النباتية (White, 1963; Yamada and Hashimoto, 1988)

أهداف زراعة الأنسجة النباتية

١- إكثار النباتات التى يصعب إكثارها بالبذور

زراعة الأنسجة النباتية وسيلة لإكثار النباتات التى يصعب إكثارها بالبذور لعدم قدرتها على تكوين بذور أو تنتج بذورا بكميات قليلة جدا أو بذور تفقد حيويتها بسرعة أو نسبة التلقيح الخلطى مرتفعة مما يؤدى إلى إنتاج نسل غير متجانس وراثيا Heterogeneous progeny.

٢- الإكثار السريع للمشتلات Rapid multiplication

تستخدم زراعة الأنسجة فى الإكثار التجارى للنباتات لما تتميز به من صغر حجم الجزء النباتى المستخدم فى الإكثار، وصغر المساحة المطلوبة للزراعة، وسهولة توفير كل من البيئة الغذائية والمناخية المناسبة، وإنتاج أعداد كبيرة من النباتات فى فترة قصيرة على مدار السنة دون التقيد بالموسم الزراعى. ففى خلال سنة واحدة وباستخدام جزء نباتى واحد تم الحصول على ٤ ملايين نبات أوركيد جنس

سيمبيديم Cymbidium و ٣٠٠ ألف نبات اسبرجس Asparagus. كما وجد أن إنتاج ١٠ آلاف نبات. قرنفل قابلة للتسويق بالزراعة التقليدية تحتاج إلى توفير ٦٦٧ نباتا في مساحة ١٧ مترا مربعا. بينما إنتاج نفس العدد من نباتات القرنفل في الزراعة المعملية يكفي تدبير ٣ نباتات فقط تشغل ٠,٠٨ متر مربع (Morel, 1960).

٣- إنتاج نباتات خالية من الأمراض الفيروسية

بزراعة المرستيم الطرفى يمكن إنتاج نباتات خالية من الأمراض الفيروسية والبكتيرية والفطرية. وتطبق المعاملة الحرارية للمساعدة على التخلص من الفيروسات. وقد نجحت الزراعة المعملية فى إنتاج نباتات بطاطس وطماطم وفراولة وقرنفل وغيرها خالية من الفيروس.

٤- إنتاج نباتات أحادية العدد الكروموسومى Production of haploid plants

هى نباتات عقيمة لا تنتج بذورا، وتحتوى على نصف العدد الكروموسومى (n). بينما النباتات الثنائية خصبة وقادرة على تكوين بذور. وتنتج النباتات الأحادية بالزراعة المعملية للمتوك أو حبوب اللقاح أو البيضة. ثم تعامل النباتات الأحادية بالكولشيسين لمضاعفة العدد الكروموسومى والحصول على نباتات ثنائية نقية خصبة متجانسة، بدون الدخول فى عمليات التلقيح الذاتى لعدة سنوات للحصول على سلالات نقية. ولهذه الطريقة أهمية كبيرة فى مجال تربية وتحسين النباتات وإنتاج نباتات محورة وراثيا (Wang, et al., 1973; Wenzel and Uhrig, 1981).

٥- إنتاج هجن بدمج البروتوبلاست Protoplast fusion

باندماج بروتوبلاست خليتين مختلفتين يتكون بروتوبلاست هجين فى خلية واحدة، فإذا زرعت خلية البروتوبلاست المندمج (الهجين) فى المعمل ينتج نبات يحتوى على مجموعتين من الكروموسومات إحداها قادم من الأم والثانية من الأب

بصرف النظر عن وجود توافق أو عدم توافق بينهما. والنباتات الناتجة من الزراعة العملية لها صفات وراثية مختلفة عن صفات الأب والأم كل على حدة.

٦- استحداث الطفرات Mutation induction

تحدث طفرات بنسبة عالية وبصورة تلقائية أثناء الزراعة الثانوية للكاس. كذلك يمكن الحصول على طفرات بمعاملة النباتات العملية أو أجزاء منها بمطفرات كيميائية أو بأشعة جاما أو أشعة-X، ثم زراعتها على بيئة مناسبة وانتخاب ما يحدث من تغييرات وراثية مناسبة. وتثبت الصفة المنتخبة من خلال الزراعة العملية المفكرة. ثم متابعتها بعد زراعتها في الحقل لعدة أجيال مع الانتخاب المستمر للنباتات الحاملة للصفة المطلوبة.

٧- المحافظة على الأصول الوراثية

تحفظ الأصول الوراثية في بنوك خاصة لحمايتها من التدهور أو الاندثار. ويتم ذلك بطرق مختلفة لمنع نموها والمحافظة على حيويتها لفترة طويلة. وتسهل طرق حفظ الأصول الوراثية تبادل الأصول الوراثية و تصدير الأصناف التجارية بتكاليف منخفضة جدا.

٨- تحديث وإكثار الأشجار والشجيرات الخشبية

بزراعة الأنسجة يمكن تحديث عمر الأشجار المعمرة وإنتاج كميات كبيرة من الشتلات، كما أن لها أهميتها بالنسبة للأشجار والشجيرات التي يصعب إكثارها خضريا.

٩- إنتاج مركبات ثانوية

ومن أمثلة ذلك استخدام زراعة الخلايا في إنتاج الكابيسيسين Capsaicin من ثمار الفلفل *Capsicum frutescens*، ومادة Tropane alkaloids من نبات الداتورا *Datura innoxia*. حيث تزرع خلايا النبات في مخمر Fermenter يحتوي على بيئة غذائية

مناسبة لزيادة عددها بكمية كبيرة. ثم تنقل إلى مخمر آخر يحتوى على بيئة إنتاج Production medium ثم تستخلص المادة الفعالة منها.

١٠- الإخصاب المعلى

يجرى الإخصاب المعلى للتغلب على بعض الظواهر الطبيعية التي تعوق تكاثر النباتات بطريقة طبيعية مثل ظاهرة العقم الأندوسيرمي ومشاكل التهجينات الجنسية وعدم التوافق وفشل حبوب اللقاح فى النباتات.

عوامل إنجاح زراعة الأنسجة

يجب توفير مهارات فنية وأجهزة ومعدات خاصة. وأن يكون معدل إنتاج معمل زراعة الأنسجة متعشياً مع احتياج الأسواق المحلية والخارجية لكى تنخفض تكاليف الإنتاج. كما يجب تحديد خطوط الإنتاج والنوع النباتى المطلوب إنتاجه. واختيار الطريقة المناسبة لإكثاره فى المعمل. والاستفادة من ظاهرة عدم الثبات الوراثى فى مرحلة إنتاج الكالس لاستحداث طفرات جديدة. وهى خاصية تهتم مربى النباتات واستحداث الطفرات.

مراحل الزراعة المعملية Propagation stages

قسم (Murashige, 1961, 1964, 1974) خطوات زراعة الأنسجة النباتية إلى:

- ١- مرحلة إنتاج نباتات الأم Mother plants.
- ٢- مرحلة فصل وتجهيز الأجزاء النباتية Isolation of explants من نباتات الأم.
- ٣- مرحلة زراعة الأجزاء النباتية Explants culture.
- ٤- مرحلة الزراعة الثانوية Subculture لإكثار الكالس أو النباتات.
- ٥- مرحلة أقلمة النباتات Hardening والزراعة فى التربة.

١- مرحلة إنتاج نباتات الأم

١- نباتات الأم هي نباتات مرجعية وهي المصدر الآمن لفصل أجزاء نباتية تستخدم فى الزراعة العملية. ولتحديث نباتات الأم تفصل عقل منها بطول ١٥ - ٢٠ سم. ثم تجزأ العقل إلى أجزاء (Micro-stocks; Explants) لاستخدامها فى الزراعة العملية. والأجزاء المفصلة من نباتات حديثة العمر تنتج نموات متجانسة فى المعمل وبنسبة نجاح أعلى، وتنتج جذورا عرضية أكثر، ونموها أفضل من الأجزاء المفصلة من نباتات بالغة.

٢- فى الزراعة التجارية التى تلجأ غالبا إلى النباتات النامية فى الحقل، وهى نباتات عادة تكون شديدة التلوث لتعرضها الدائم للتربة والآفات الناقلة للأمراض وتحتاج إلى تعقيم يتناسب مع شدة تلوثها. لذلك يجب اختيار أفضل النباتات من حيث قوة النمو وتجانسها وراثيا فى صفاتها من حيث سرعة النمو والتبكير فى النضج وإنتاج الأزهار ولونها وجودة ثمارها .

٣- استبعاد النباتات التى كانت مصابة بأمراض فيروسية وفطرية وبكتيرية ومسببات نقل العدوى مثل الحشرات الثاقبة الماصة مثل المن والعنكبوت الأحمر والذبابة البيضاء. واستبعاد النباتات التى تعرضت لضغوط بيئية أثناء نموها مثل البرودة الشديدة والجفاف الشديد وقصر الفترة الضوئية وعدم انتظام شدة الضوء. وتؤدى شدة البرودة إلى انكسار طور السكون وظهور أمراض البرودة ويؤدى الجفاف وعدم وفرة الضوء إلى ضعف النمو.

احتياج نباتات الأم -

● الحالة الغذائية Stock plant nutrition

من المتوقع أن يتأثر محتوى الأجزاء النباتية بالمعاملات السابقة التى تطبق على نباتات الأم. وأن المحتوى الداخلى من الهرمونات والعناصر الغذائية فى الأجزاء

النباتية هو امتداد لما يحتويه نبات الأم. لذلك يجب اختيار نباتات أم جيدة النمو. وأن تكون خالية من الأمراض وخاصة الأمراض الفيروسية. ويفضل أن تكون من إنتاج معمل زراعة الأنسجة، وتربى فى حجرة النمو أو فى صوبة محمية من الآفات الناقلة للأمراض، مع توفير رعاية منتظمة ومنضبطة من الناحية الغذائية والبيئية. ويراعى خفض الرطوبة النسبية فى الصوبة بقدر الإمكان، وأن يكون الرى بالتنقيط أو بالانتشار تحت سطح التربة بدلا من الرى بالرش لحمايتها من الأمراض. والأجزاء المفصولة من نباتات الأم غالبا لا تحتاج إلى تعقيم.

● الفترة الضوئية Photoperiod

للفترة الضوئية تأثير فسيولوجى كبير على بعض الأنواع النباتية المستخدمة كأمهات. وتحتاج نباتات الأم غالبا من ١٢ إلى ١٦ ساعة يوميا. وتؤدى إطالة الفترة الضوئية إلى استمرار التمثيل الضوئى وتنشيط نمو الأجزاء النباتية المفصولة منها. وتقصر الفترة الضوئية يؤدى إلى ضعف نباتات الأم.

وللكثافة الضوئية Light intensity تأثير هام على نمو النباتات المعملية. فتححتاج كثير من الأنواع النباتية إلى ٤٠٠٠ لكس لكى ترتفع حيويتها. وقد يحتاج البعض الآخر إلى شدة إضاءة منخفضة. ولذلك يوصى بتعريض نباتات الأزاليا الأم لكثافة ضوئية متوسطة $10\text{MM}/\text{m}^2$ للحصول على أفضل نموات خضرية تستخدم فى الزراعة المعملية. وقد يرجع ذلك إلى أن شدة الضوء المرتفعة تسبب فقد الأكسينات الداخلية Endogenous auxin التى لها دور هام فى تكوين الجذور.

ويعتقد أن الضوء الأحمر Red light له علاقة بانخفاض الأكسين وزيادة السيتوكاينين فى البيئة الغذائية. وأن الأشعة Near- Ultraviolet لها علاقة بانخفاض محتوى الأكسين. ويفسر ذلك نشاط تكوين نموات خضرية من أجزاء نباتية مختلفة. ولوحظ أن زراعة القمم النامية المفصولة من أفرع كانت مظلة لستة أصناف من أمهات العنب أنتجت عددا أكبر من الأفرع المعملية بالمقارنة بالمفصولة من أفرع نامية فى جو مشمس بصورة كاملة. ويفسر ذلك بأن النباتات المظلة تستقبل ضوءا مرشحا ترتفع

فيه موجات الضوء الأحمر الذى له القدرة على إنتاج قدر كبير من السيتوكاينين الداخلى Endogenous Cytokinin الذى يحسن نمو النباتات تحت ظروف الضوء المنخفض (Economou, 1982; Economou and Read, 1987).

● الحرارة Temperature

تختلف النباتات فى احتياجها من الحرارة المنخفضة أو الحرارة المرتفعة. لذلك يجب إنماء نباتات الأم تحت ظروف من الحرارة المناسبة حتى تكون مصدرا جيدا للأجزاء النباتية المطلوب زراعتها فى المعمل. فمثلا تعريض بصيلات نباتات الليلى Lily الأم لفترات مختلفة من التخزين عند 4°م كان له تأثير إيجابى قوى على عدد ووزن البصيلات الناتجة فى المعمل من زراعة أوراق حرشقية مفصولة من نباتات الأم.

● منظمات النمو Growth regulators

رش نباتات الطماطم الأم بمادة Chloromequat chloride تركيز ٢٠٠٠ جزء فى المليون يؤدى إلى زيادة واضحة فى نمو الأجزاء المفصولة منها فى المعمل. كذلك وجد زيادة فى نمو الكالس والنباتات الناتجة من زراعة أجزاء ورقية مفصولة من نباتات Dahlia و Petunia بعد رشها بمادة Diaminozide بتركيز ٢٠٠٠ جزء فى المليون. لذلك يفضل رش نباتات الأم بالسيتوكاينين أو غمس الأجزاء المفصولة منها قبل زراعتها فى محلول منظم للنمو يحتوى على سكر وبعض الهرمونات مثل BA; GA أو زراعتها فى بيئة سائلة تحتوى على تركيزات مختلفة من (de Langthe and BA de Bruijne, 1976).

٢- مرحلة فصل وتجهيز الأجزاء النباتية

فصل وتعقيم الجزء النباتى Explant

يفضل فصل الأجزاء من نباتات معملية مربية فى حجرة النمو أو فى الصوبة. ويعد تعقيمها تشطف عدة مرات فى ماء مقطر لإزالة آثار مادة التعقيم، ثم

تجفف سطحيا وترص على ورق ترشيح معقم أو مسطح زجاجي معقم باستخدام ملقط معقم. ويستخدم سلاح شفرة معقم فى التخلص من أى جزء تغير لونه أو عند تجزئة الجزء النباتى إلى أحجام أصغر. ويتم التجزئة تحت ميكروسكوب داخل كابينة الحقن. ويستخدم ثاقب فلين لفصل أقراص من أوراق أو من أنسجة داخلية للدرنات. وقد يستخدم جهاز خاص لتقطيع العينات وفصل أجزاء محددة فى الحجم أو الوزن. ويستخدم ورق ألومنيوم معقم عند وزن الجزء النباتى بعد فصله. ويؤخذ فى الاعتبار الحجم المناسب للجزء النباتى لأهمية ما يحتويه من هرمونات ومواد غذائية. ويجب تقليل مساحة الأسطح المجروحة لأنها مصدر لانبعاث الإيثيلين. أما البذور فيمكن زراعتها مباشرة على بيئة مناسبة بعد تعقيمها وشطفها جيدا. وقد تفصل كل من الأجنة والفلقات لزراعتها على حدة. وقد يفضل غمر أو تعويم الأجزاء النباتية فى محلول سيتوكاينين مناسب لرفع محتواها من السيتوكاينين لما له من أهمية كبيرة فى تكوين النموات الخضرية. وثبت أن معاملة أجزاء ورقية من البيتونيا *Petunia hybride* بالسيتوكاينين قبل زراعتها على بيئة خالية منها يؤدى إلى إنتاج نموات خضرية مساوية أو تزيد عن النموات الناتجة من بيئة مضاف إليها نفس السيتوكاينين. كذلك وجد أن غمس ورقة كاملة فى محلول ٤٠٠ جزء فى المليون بنزابل أدينين (BA)، ثم زراعة أجزاء مفصولة منها فى بيئة خالية من السيتوكاينين كان لها تأثير إيجابى كبير فى إنتاج نموات جيدة.

٣- مرحلة زراعة الأجزاء النباتية Explant culture

يزرع الجزء النباتى المعقم فى تماس مع البيئة الغذائية المناسبة إما قطبيا Polar أى قائما Straight up، بحيث تكون القمة متجهة إلى أعلى والقاعدة الفسيولوجية منعكسة فى البيئة، وإما غير قطبى Apolar أى مقلوبا Upside down بحيث تكون القاعدة الفسيولوجية بعيدة عن البيئة وتكون القمة منعكسة فيها. ويفضل زراعة نباتات العائلة

Amaryllidaceae فى العمل بطريقة قطبية لأنها تعطى جذورا عرضية أفضل، بينما يفضل البعض الزراعة بطريقة غير قطبية لتسهيل نمو الجذور والسوق وتيسير الإمداد بالأكسجين وعدم ظهور آثار ضارة ناتجة عن مواد سامة يفرزها الجزء النباتى (Pierik and Steegmans, 1975). وزيادة الأسطح المجروحة تساعد على زيادة امتصاص العناصر ومنظمات النمو من البيئة، إلا إنها تؤدي فى نفس الوقت إلى زيادة انطلاق غاز الإيثيلين الضار. لذلك يجب تقليل مساحة الأسطح المجروحة بقدر الإمكان على الجزء النباتى حتى لا تكون سببا فى فشل نموه. ويفضل إزالة طبقة الأوعية الإسكلرانشيمية من الجزء النباتى حتى لا تكون عائقا لتكوين الجذور.

الأجزاء المستخدمة فى الزراعة العملية

● كالكس Callus

إنتاج الكالكس وسيلة سريعة للحصول على أعداد كبيرة من النباتات Plantlets. وتنجح هذه الطريقة مع بعض الأنواع النباتية دون غيرها. وهى طريقة مستحبة على المستوى التجارى وعند مربي نباتات الزينة واستحداث الطفرات. ويظهر عن الكالكس طفرات ذاتية كثيرة إذا كانت البيئة تحتوى على تركيز مرتفع من السيروتوكاينين. وتحدث الطفرات فى خلايا الكالكس نتيجة التضاعف أو التوزيع غير المنتظم للكروموسومات.

● بادرات معملية Plantlets كاملة أو مجزأة

يمكن الحصول على بادرات كاملة بزراعة بذور معقمة على بيئة مناسبة. وقد تفصل البادرات وتهذب بإزالة الأوراق والجذور وتجزأ إلى عقل وحيدة البرعم ثم تزرع هذه العقل فى بيئة مماثلة لإنتاج نباتات كاملة. وقد تفصل أجزاء من الأوراق أو الجذور أو الأزهار وتزرع فى العمل لإنتاج كالكس يتكشف بعد ذلك إلى بادرات.

● أجنة Embryos

تزرع الأجنة فى بيئة غذائية بعد فصلها من البذور واستبعاد القصرة والفلقات. وقد تفصل السويقة الجنينية من الجنين لزراعتها فى المعمل.

● نسيج مرستيمى Meristemic tissue

هى طريقة مفضلة بالرغم من انخفاض نسبة نجاحها بالمقارنة بزراعة البراعم، ولكنها الطريقة الرئيسية لإنتاج نباتات خالية من الأمراض الفيروسية. ويحتوى المرستيم على خلايا سريعة الانقسام. ويفصل المرستيم من طرف القمة النامية للفرع بعد استبعاد جميع الأوراق المحيطة بها ماعدا ١ - ٢ من منشئات الأوراق، ثم يزرع المرستيم بعد فصله مباشرة فى بيئة غذائية صلبة. ويتم فصل المرستيم وزراعته داخل الكابينة المعقمة. والقمة المرستيمية الصغرى فرصتها أكبر للحصول على نباتات خالية من الفيروس.

● براعم طرفية وجانبية Auxiliary and Terminal bud

تزرع البراعم الطرفية والجانبية على الساق الرئيسى والأفرع الجانبية فى بيئة غذائية مناسبة لتحفيزها على النمو. ويجب اختيار البراعم المحتوية على بعض الأوراق الأولية، وألا تكون البراعم فى حالة سكون. ويتم اختيار الأفرع حديثة العمر قوية النمو، ويفضل نقعها فى الماء قبل فصل البراعم منها.

● متوك وحبوب لقاح Anther and Pollen grains

تزرع المتوك وحبوب اللقاح بهدف إنتاج نباتات أحادية Haploid تحتوى على نصف العدد الكروموسومى للخلية الجسمية. ثم تعامل النباتات الأحادية الناتجة بالكولشيسين لمضاعفة العدد الكروموسومى بها وإنتاج نباتات ثنائية متجانسة.

● خلية واحدة Single cell

يتم تفكيك خلايا نسيج أو كالس فى بيئة سائلة ميكانيكيا أو إنزيميا. ثم تلتقط خلية واحدة من معلق الخلايا المتكون بماصة ميكرومترية ، ثم تزرع منفردة فى بيئة سائلة أو بيئة صلبة تحتوى على آجار، فتتحول الخلية بسهولة إلى جنين جسمى Somatic embryo قادر على الكشف إلى نبات كامل. والنباتات الناتجة تكون مطابقة لمواصفات الأم Cell line وتستخدم هذه الطريقة بنجاح مع عديد من النباتات الراقية.

● بروتوبلاست Protoplast

يتميز البروتوبلاست بقدرته على الاندماج والتكتل. ويستفاد من هذه الظاهرة فى دمج بروتوبلاست لخليتين من الخلايا الجسمية. ويستلزم لذلك هضم الجدر الخلوية للخليتين بفعل الإنزيمات لإطلاق البروتوبلاست منهما واندماجهما، ثم إعادة تكوين الجدار الخلوى للخلية الهجينية الجديدة. وبزراعة الخلية الهجين فى بيئة غذائية مناسبة يتكون جنين جسمى ينمو ويكون نموات خضرية وجذرية.

الزراعة فى الأنابيب والدوارق المخروطية

تمسك الأنابيب والدوارق المخروطية المحتوية على بيئة محتوية على آجار فى وضع أفقى. ويقلل هذا الوضع التلوث بشدة خصوصا إذا كانت الزراعة خارج الكابينة المعقمة. ويجب تجنب تعريض فوهة الأنابيب أو الدوارق إلى اللهب إذا كانت الزراعة داخل الكابينة حتى لا يؤدى إلى إنتاج الإيثلين وتجمعه داخلها. وتحتاج زراعة البذور أو الأنسجة المرستيمية إلى تثبيتها على سطح البيئة الصلبة بالضغط عليها برفق باستخدام إبرة الحقن أو ما يماثلها. لأن غمس البذرة أو النسيج بالكامل فى البيئة يعرضهما إلى نقص الأكسجين. بينما بالنسبة للبراعم أو أجزاء من النخاع أو أى جزء آخر فيغمس نصفها تقريبا فى الآجار حتى لا يتعرض إلى نقص الأكسجين. ويراعى المحافظة على قطبية الجزء النباتى عند زراعته، إن

كان قائما Straight up (Polar) أو مقلوبا Upside down (Apolar) وهذا يتوقف على نوع النبات. فتتكون الجذور العرضية على المنطقة القاعدية للجزء النباتي إذا زرع قائما. وإذا كان الجزء النباتي مفصولا من نبات مفترش غير قائم فيفضل زراعته في وضع أفقى على البيئة الغذائية، وقد تتكون الجذور العرضية بصورة أفضل في بعض النباتات إذا زرع الجزء النباتي مقلوبا.

العوامل المؤثرة على نمو الجزء النباتي فى المعمل

(أ) عوامل خاصة بالجزء النباتي

● تجانس وحجم الجزء النباتي

يجب أن تكون الأجزاء النباتية متجانسة فى خلاياها، ويؤدى عدم التجانس إلى تكوين كالس غير متجانس الخلايا، والنموات الناتجة منه تكون غير متجانسة فى النمو والتركيب الوراثي. كذلك يؤثر حجم وشكل الجزء النباتي على نموه. فقد يفشل فى النمو إذا قل حجمه عن القدر المناسب، وإذا كبر حجمه يكون له قدر كبير فى النجاح والنمو. وقد يرجع ذلك إلى احتوائه على كمية أكبر من المواد الغذائية وعدد أكبر من الخلايا مما يزيد من إنتاج نموات كثيرة. لذلك يفضل تحديد حجم الجزء النباتي وشكله وتركيبه فمثلا الأجزاء المفصولة من مناطق التخزين فى البطاطس والبطاطا واللفت والجزر وغيرها فيفضل فصل جزء أسطوانى منها بأبعاد 2.4 x 20 ملليمتر لأن الشكل الأسطوانى يتيح فرصة أفضل لامتصاص العناصر الغذائية من البيئة وتبادل الغازات. كما أن لمنظمات النمو والعناصر الغذائية المفردة من الأسطح المجروحة بالجزء النباتي لها دور فعال فى تنشيط الانقسام وتكوين الكالس. ويوصى بأن الحد الأدنى لوزن القطعة من جذر الجزر هو ٣,٨ ملليجرام حيث يحتوى على ٢٥ ألف خلية تقريبا. بينما نفس الكتلة من درنات الخرشوف تحتوى على عدد أقل من الخلايا نظرا لكبر حجمها. ولذلك يوصى بأن تكون كتلة القطعة من درنات

الخرشوف ٨ ملليجرام حيث تحتوى على ٢٠ ألف خلية تقريبا. وأن يفصل الطرف المرستيمى من القمة النامية لنباتات البطاطس أصغر من ذلك لضمان إنتاج نباتات خالية من الفيروس.

● النمط الوراثى للنبات Genotype

تختلف قدرة النباتات على النمو والتكاثر المعملى باختلاف نوعها وتركيبها الوراثى. فمن الثابت صعوبة تكوين الجذور العرضية على أجزاء ورقية من نبات *Kalanchoe farinaceae* إذا زرعت فى الحقل، بينما يسهل ذلك بزراعتها فى بيئة غذائية مناسبة فى المعمل. وعموما يسهل تكاثر النباتات ثنائية الفلقات -Dicotyledons فى المعمل عن النباتات أحادية الفلقات -Monocotyledons. والنباتات التى تتكاثر خضرىا بسهولة فى الحقل يسهل تكاثرها فى المعمل. كما أن بعض العائلات والأجناس النباتية لها قدرة عالية على التكاثر مثل العائلة -Solanaceae ومنها الأجناس *Petunia; Datura; Lycopersicon; Nicotiana; Solanum* ، والعائلة -Cruciferae ويتبعها الأجناس *Arabidopsis; Brassica Lunaria* ، والعائلة -Gesneriaceae ويتبعها الأجناس *Streptocarpus Achimenes; Saintpaulia* ، والعائلة -Compositae ومنها الأجناس *Chrysanthemum; Chichorium Lactuca* ، والعائلة -Liliaceae ومنها الأجناس *Lil (George, 1993) ium; Ornithogalum; Haworthia; Allium*

● العمر الفسيولوجى Physiological age

الأنسجة الجنينية والأنسجة الحديثة Juvenile أكثر قابلية للنمو والتكوين الشكلى Morphogenesis عند زراعتها معمليا بالمقارنة بالأنسجة المتقدمة فى العمر Adult. وتنخفض قدرة الأشجار والشجيرات على التكاثر المعملى بتقدمها فى العمر، لذلك يجب إنتاج نباتات حديثة منها. ويفضل للزراعة المعملية استخدام

أجزاء نباتية حديثة العمر مثل الأنسجة المرستيمية والبادرات الحديثة. وتختلف بعض الأنواع النباتية فى هذا المضمون العام مثل-*Anthurium andreanum* Lu. كما أن الأجزاء النباتية المفصولة من نباتات يسهل تكاثرها خضريا تكون أفضل للزراعة العملية عن الأجزاء المفصولة من نباتات لا تتكاثر خضريا. كذلك البراعم الساكنة والبذور الساكنة تكون أصعب فى النمو فى المعمل بالمقارنة بغيرها غير الساكنة. وقد تزداد قدرة النمو والتكاثر للأجزاء النباتية المفصولة أثناء فترة تزهير بعض النباتات بصرف النظر عن عمرها مثل *Ranunculus acris*; *lus secleratus*; *Freesia*; *Launaria* حديثة العمر هى الأفضل فى الزراعة العملية لأنها نشطة وقادرة على الانقسام والتكاثر بالمقارنة بالقمم النامية المفصولة من سوق متقدمة العمر. بالرغم من ذلك تنجح زراعة القمم النامية والأنسجة المرستيمية المفصولة من سوق متقدمة فى العمر لبعض النباتات مثل:

Rhododendron hybrids; *Sequoia sempervirens*; *Malus sylvestris*; *Pinus pinaster*; *Cryptomeria japonica*; *Vitis vinifera*; *Thuja occidentalis*

(ب) عوامل خاصة بالبيئة المحيطة

● طول الفترة الضوئية Photoperiod

المرحلة الأولى لنمو الأجزاء النباتية لأنواع كثيرة من النباتات لا تتأثر إن كانت فى ضوء أو ظلام. بينما فى مراحل النمو التالية يكون من الضرورى تتابع فترتى الضوء والظلام لتكوين نموات خضرية وجذور. وكان ذلك مؤكدا بالنسبة للنموات الناتجة من زراعة براعم زهرية حديثة للفريزيا *Freesia*. وقد يستلزم وجود الضوء لإنبات بعض أنواع البذور، بينما يستلزم وجود الظلام لإنبات بذور أنواع أخرى مثل الأوركيد (Pierik and Steegmans, 1975). وتؤثر طول الفترة الضوئية على نمو الأجزاء النباتية وتكوين النباتات فى المعمل. ويختلف هذا التأثير باختلاف

نوع النبات. وتعتبر ١٢ ساعة ضوءاً هي الأفضل لنشوء وتكوين نموات على أجزاء مفصولة من درنات نبات *Helianthus*. وأن ١٥-١٦ ساعة ضوءاً هي الأفضل لتكوين أجنة على كالس نبات *Geranium*، بينما تنخفض عدد الأجنة المتكونة بإطالة أو تقصير الفترة الضوئية عن ذلك. ويتغير لون الكالس إلى اللون الأخضر ولا تتكون منه أجنة إذا كان نامياً في ظلام تام. بينما لم يتأثر تكوين النموات الجديدة بزرعة المرستيم القمي لنبات *Pharbitis nil* تحت ظروف ١٦-٢٤ ساعة ضوءاً. كما ثبت أن مستوى الأكسجين والسيتوكينين داخل النسيج يتأثر بإطالة الفترة الضوئية في الأنسجة المرستيمية المفصولة من نباتات تحتاج أصلاً إلى فترة ضوئية طويلة.

● شدة الإضاءة Light intensity

لم يتم حتى الآن تحديد أفضل شدة إضاءة مناسبة لنمو الأنسجة النباتية المختلفة، وقد يرجع ذلك إلى اختلاف احتياج النباتات باختلاف مراحل النمو والنوع النباتي، فقد وجد أن ١٠٠٠ لكس Lux هو أفضل شدة إضاءة في المرحلة الأولى والثانية من الزراعة الثانوية للأنسجة والخلايا النباتية، وقد تزداد إلى ٣٠٠٠-١٠٠٠٠ لكس في المرحلة الثالثة. ويتطلب زيادة شدة الإضاءة بعد نقل النباتات من البيئة الغذائية إلى التربة. ويجب ألا تصل الكثافة الضوئية في المعمل إلى نفس المستوى السائد في الحقل أو الحجرية الضوئية (تقدر ما بين ٣٠-٧٠ وات/متر مربع)، لأن زيادة شدة الضوء داخل المعمل عن القدر الأمثل والمناسب للزراعة العملية يسبب أضراراً كثيرة. فقد لوحظ نشاط نمو الأجزاء النباتية المزروعة في المعمل عند شدة إضاءة منخفضة (٨-١٦ وات/متر مربع)، وقد يحدث النمو في المعمل عند شدة إضاءة أقل من ذلك. ويفضل اختيار الشدة الضوئية المنخفضة لأن التمثيل الضوئي في الأجزاء النباتية المزروعة والنموات الحديثة الناتجة منها يكون ضعيفاً لعدم اكتمال تكوين الكلوروفيل، خصوصاً إذا انخفض تركيز ثاني أكسيد الكربون فوق الآجار. ويمكن تعويض النقص في الشدة الضوئية بإضافة السكر للبيئة الغذائية، إلا إن الإضافة الزائدة من السكر قد تؤدي إلى ضعف سرعة نمو النباتات في المعمل.

● طول الموجة الضوئية Wave length

فى حالة النباتات التى تتأثر بطول الموجة الضوئية Photomorphogenic plants يتم السيطرة عليها بإضافة صبغة الفيتوكروم Phytochrome لقدرتها على امتصاص الضوء بطول موجه (٦٦٠ نانوميتر) وتتحول إلى صبغة Phytochrome - red (Pr). فإذا تعرضت الصبغة (Pr) إلى الأشعة الحمراء تتحول إلى صبغة Phytochrome far red (Pfr) التى تستطيع امتصاص الأشعة بطول (٧٣٠ نانوميتر). ويحدث تحول صبغة الفيتوكروم من (Pr) إلى (Pfr) ببطء فى الظلام وبسرعة عندما تتعرض للأشعة الحمراء البعيدة Far red، وتسيطر صبغة (Pfr) على التكوين النباتى عن طريق تحفيز الجينات بطريقة مباشرة أو غير مباشرة. وفى دراسة على أنسجة نبات التبغ ثبت وجود اختلاف فى قدرة كل من الضوء الأحمر والأخضر بالمقارنة بالضوء الأزرق على تحطيم هرمون اندول حمض الخليك (IAA) المضاف للبيئة الغذائية، حيث يعمل الضوء الأزرق على تحطيم هذا الهرمون، بينما ليس له تأثير على هرمون نقتالين حمض الخليك (NAA)، مما يؤدى إلى إضعاف النمو. وهذه النتائج لا تماثل نتائج نباتات الكريزانتيم *Chry-* *santhemum* والداليا *Dahlia* (Bauchesne, et al., 1970). ولوحظ أن الضوء الأحمر (٦٦٠ نانوميتر) يشجع على تكوين الجذور العرضية على الأجزاء المفصولة من نبات الطرطفة *Helianthus tuberosis* أكثر من الضوء الأزرق. وأن نمو كالس نبات *Pel-* *argonium* كان أفضل فى وجود الضوء الأبيض (يحتوى على جميع ألوان الطيف Polychromatic)، وكان وجود الضوء الأزرق أفضل من الضوء الأخضر والأحمر أو الإظلام التام. كذلك ثبت أن الضوء الأزرق والبنفسجى ينشطان تكوين السوق العرضية من كالس التبغ، بينما يشجع الضوء الأحمر على تكوين الجذور العرضية. وفى مضمون عام ثبت أن الضوء الأبيض عادة يشبط تكوين الجذور العرضية وينشط تكوين السوق العرضية، بينما فى معظم الحالات ينشط الضوء الأحمر تكوين الجذور العرضية لنبات (*Pseudotsuga menziesii*) ونبات الكرنب *Brassica oleracea*.

● مصدر الضوء Light source

تستعمل لمبات فلورسنت بيضاء باردة عادة لإضاءة معامل زراعة الأنسجة. ويستخدم في بعض المعامل لمبات فلورسنت قوة ٣٨ وات (38W, Fluorescent-Tubes, Philips, Type 33)، مع أن لمبات الصوديوم قد تعطي نتائج أفضل. وأن تكوين الجذور على أجزاء ورقية من نبات *Kalanchoe* كانت أفضل بتعريضها لضوء من لمبات Interna 39 and Warm White de Lux 32، لاحتوائه على ضوء أحمر يرتقالي Orange-red light ينسبة أعلى. وأن اللمبات التي ينبعث منها نسبة مرتفعة من الأشعة فوق البنفسجية (UV) كان لها تأثير مثبط على تكوين الجذور العرضية. وثبت أن الضوء المنبعث من لمبة فلورسنت يضعف منذ اللحظة الأولى من بدء تشغيلها، فإذا كانت كمية الضوء المنبعث عند بداية التشغيل ١٠٠٪ فإنها تنخفض لتصبح ٩٣٪ بعد ٨ أيام، ثم تصل إلى ٨٦٪ بعد ٤ أشهر ثم ٧٠٪ بعد ١٢ شهرا. (Norton and Norton, 1986).

● الحرارة Temperature

تختلف درجات الحرارة المناسبة لنمو الأجزاء النباتية باختلاف أنواعها. ولذلك يجب تزويد حجرة النمو بجهاز تكييف يعمل ذاتيا لتثبيت درجة الحرارة، وأن تفصل النباتات المتماثلة في احتياجاتها الحرارية في حجرة زراعة واحدة. وللحرارة المنخفضة أهمية في كسر سكون البزاعم والبذور وتحسين نموها، لذلك يجب تعريضها وهي في مرحلة السكون إلى حرارة منخفضة لفترة زمنية حتى ينكسر سكونها ومن هذه النباتات التفاح والكمثرى والعنب والصنوبر *Pine* كما أن اختلاف الحرارة بين النهار (٢٦°م) والليل (١٥°م) وتعاقبهما بصورة مستمرة ومنظمة يؤدي إلى زيادة عدد الجذور المتكونة على الأجزاء المفصلة من درنات الطرطوفة *Heli-anthus tuberosus* والجزر Carrot وذلك بالمقارنة بتلك المعرضة لحرارة ثابتة في النهار والليل. وكان أفضل نمو لها عند ٢٦°م في النهار و ٢٠°م في الليل (Skoog,

(et al., 1974). ويعتبر المدى ٢٦-٢٨ م° هو أنسب درجات حرارة لنمو معظم الأجزاء النباتية و١٨ م° للأنواع المكونة للأبصال والدرنات و٢٨-٢٩ م° للأنواع الاستوائية. وتزرع أغلب الأجزاء المفصولة من أشجار الفاكهة ما بين ٢٣-٣٢ م° ، حيث ينمو كالس أشجار التفاح جيدا عند ٢٠-٣٢ م°، ويكون نموها ضعيفا عند أقل من ٢٠ م°. بينما الأجزاء المفصولة من الأفوكادو Avocado تحتفظ بحيويتها عند ٥٥ م°. ووجد أن أنسب حرارة لنمو الأجزاء المفصولة من البطاطا *Ipomoea* والنامية في بيئة سائلة هي ٢٥-٣٢ م° والأجزاء المفصولة من نبات *Rhododendron* والرجس *Narcissus* هي ٢٥ م°، والليليم *Lilium auratum* هي ٢ م°.

● الرطوبة Humidity

بالرغم من قلة الدراسات عن تأثير الرطوبة داخل حجرة النمو، إلا إن ارتفاع الرطوبة بها قد يؤدي إلى ارتفاع نسبة التلوث. وزيادة الرطوبة في البيئة الغذائية المنزرعة تؤدي إلى زيادة تكثيف بخار الماء على الجدار الداخلي لها. مما يؤدي إلى ظهور التزجج Vitrification وهي ظاهرة تؤدي إلى موت الأنسجة المنزرعة في العمل. ويمكن التحكم في هذه الظاهرة بزيادة تركيز الآجار في البيئة الغذائية.

● الأكسجين Oxygen

التهوية الجيدة لها أهمية كبيرة لمساعدة الخلايا والأنسجة وغيرها على النمو. ويتم تحقيق ذلك باستخدام ماكينات رج مثل Shaking machines; Orchid wheels وتناسب الدوارق المخروطية المحتوية على بيئة سائلة. ولتحسين التهوية فيها تزرع الأجزاء النباتية داخل الدوارق على كبارى ورقية. بينما يمكن تحسين التهوية داخل الأنابيب بتغطيتها بأغطية معدنية فقط ولا تستخدم سدادات قطن صوفى. وتزرع الأجزاء النباتية فيها بطريقة غير قطبية على سطح البيئة الصلبة المحتوية على آجار ولا تغمس فيها.

● ثاني أكسيد الكربون Carbon dioxide

يؤدي تجمع ثاني أكسيد الكربون إلى سمية النباتات النامية داخل أواني الزراعة العملية خاصة إذا كانت محكمة الغلق. لذلك يجب التخلص من ثاني أكسيد الكربون الزائد في الأواني المزروعة لتجنب حدوث الضرر للنباتات، مع إضافة السكرز للبيئة كمصدر هام للكربون.

● غاز الإيثيلين Ethylene gas

استخدام لهب كحول أو غازي في تعقيم فوهة الأنابيب أو الدوارق أثناء الزراعة العملية يؤدي إلى زيادة تجمع الإيثيلين داخلها خصوصا إذا كانت محكمة الغلق. وزيادة الإيثيلين تسبب الأضرار الآتية:

- تكوين خلايا نباتية غير متخصصة (كالس) مما يؤدي إلى إعاقة تكوين النباتات أو إنتاج نباتات رخوة وضعيفة.
- انخفاض تركيز اللون الأخضر أو عدم ظهوره في الأجزاء النباتية وزيادة محتوى البيئة الغذائية من اندول حمض الخليك (IAA).

(ج) عوامل خاصة بالبيئة الغذائية

● تركيب البيئة الغذائية

جميع الأجزاء النباتية المفصولة من نباتات ذات الفلقتين أو ذات الفلقة الواحدة قادرة على إنتاج كالس عند زراعتها في بيئة مناسبة. ويفضل المحافظة على مكونات البيئة المناسبة لكل مرحلة من مراحل النمو، وأي تغيير في تركيب البيئة حتى ولو كان بسيطا يؤدي إلى إحداث تغيير كبير في طبيعة نمو الكالس.

● رقم الحموضة pH- Value

رقم حموضة البيئة عند 5-6.5 يعتبر مناسباً لنمو النباتات المعلية، ويفضل ضبطه عند pH6. ويتغير تماسك البيئة المضاف إليها الآجار بانخفاض رقم الحموضة عن 5.4 أو ارتفاعها عن 7. ويسبب التعقيم بالأوتوكلاف انخفاض حموضة البيئة بمعدل 0.3-0.5 وحدة، كذلك رقم حموضة البيئة السائلة قابل للتغيير بعد زراعتها. وقد يرجع ذلك إلى إفرازات الأجزاء النباتية أثناء نموها. كذلك تتأثر حموضة البيئة بسرعة امتصاص عنصر النيتروجين. لذلك يجب العمل على ثبات رقم الحموضة بالمحافظة على التوازن بين تركيز النترات والأمونيا في البيئة الغذائية والانخفاض الشديد للحموضة يؤدي إلى:

- انخفاض امتصاص الحديد إذا كانت البيئة حامضية (4.5-5.4 pH). لذلك من الضروري جداً رفع رقم الحموضة في اتجاه نقطة التعادل بإضافة مركب Ethylene Diamine Tetra Acetate (EDTA) لضمان توفير عنصر الحديد والعناصر الأخرى.

- يصبح IAA و GA₃ وفيتامين B₁ وحمض البانتوثينيك أقل ثباتاً. وتصبح الآجار غير متماسك Sloppy.

- ترسيب لبعض الأملاح مثل الفوسفات والحديد وينخفض امتصاص أيونات الأمونيا ويتوقف النمو.

- سهولة تحلل السكريات أثناء تعقيم البيئة بالأوتوكلاف. إلى جلوكوز وفركتوز ويتحول الجلوكوز جزئياً إلى فركتوز بعد التعقيم بالأوتوكلاف إذا كانت حموضة البيئة (pH 6).

● الجهد الأسموزي Osmotic potential

تؤثر عوامل كثيرة على الجهد الأسموزي للبيئة الغذائية مثل تركيز الآجار والعناصر المعدنية والوزن الجزيئي للأملاح المعدنية وسهولة تأينها. وللسكروز تأثير نسبي في زيادة الجهد الأسموزي، والسكروز هو سكر ثنائي يتحلل أثناء التعقيم بالأوتوكلاف إلى وحدتين من السكر الأحادي مما يكون سبباً في رفع الجهد الأسموزي للبيئة. وللأملاح المعدنية الكبرى تأثير أكبر. ويختلف الجهد الأسموزي

كثيرا باختلاف محتوى البيئة من السكريات والأملاح. ويقدر الجهد الأسموزى بوحدة البار Bar أو الباسكال Pascal (البار = 10^5 باسكال). وأظهر Pierik and Steegmans, 1975 أن زيادة الجهد الأسموزى أكثر من 3×10^5 باسكال (= 3 بار) يؤدي إلى توقف النمو نتيجة توقف امتصاص الماء. ويعتبر مركب المانيتول Man-nitol من المركبات المسببة لرفع الجهد الأسموزى للبيئة ومثبط فسيولوجى للنمو. وإضافة واحد مولر من المانيتول يؤدي إلى جهد أسموزى يعادل (22.4 بار). وحديثا يضاف مركب Polychylen-glycole لتغيير الجهد الأسموزى للبيئة بدلا من المانيتول (جدول ١).

● إفرازات الجزء النباتى Explant exudates

الأجزاء المفصولة من بعض النباتات مثل الأشجار والشجيرات الخشبية تفرز صبغات بنية أو سوداء من الجروح الموجودة عليها. وهى مركبات متعددة الفينول Polyphenols وتانينات Tannins سامة تؤدي إلى توقف النمو فى مزارع الأنسجة. واقترح Anonymous (1978) المعاملات التالية للتغلب على هذه الإفرازات:

– تقليل الجروح على الجزء النباتى أو نقع الأجزاء النباتية فى الماء قبل زراعتها فى البيئة الغذائية، وإضافة القمح النشط (AC) للبيئة بتركيز 0.2 - 3.0% (وزن/ حجم).

– إضافة مركب (PVP) للبيئة الغذائية بتركيز 250 - 1000 ملليجرام/ لتر، وهو بوليمر له القدرة على إدمصاص المركبات الفينولية أو إضافة مركبات مضادة للأكسدة مثل حمض الستريك وحمض الأسكوربيك والثيوريا والسيستين وهى مركبات مانعة لأكسدة الفينولات أو إضافة ثلاثة أحماض أمينية وهى: جلوتامين Glutamine والأرجينين Arginine والأسبرجين Asparagine. كما أن تخفيض تركيز الأملاح المعدنية فى البيئة الغذائية يقلل من الجهد الأسموزى وتقل الإفرازات.

– تجديد الزراعة على بيئة سائلة طازجة يؤدي إلى انتشار الإفرازات السامة بصورة مخففة حول الجذور.

وتساعد منظمات النمو على اسوداد البيئة وأكسدة المركبات الفينولية، وعدم إضافتها يؤدي إلى توقف عمليات الأكسدة. وثبت أن إضافة مركب Diethyl-dithio carbonate (DIECA) في ماء شطف الأجزاء النباتية بعد تعقيمها بمركبات التعقيم بتركيز ٢ جرام/ لتر أو إضافة قطرات من هذا المركب وقت تقطيع وتهذيب الأجزاء النباتية وقبل زراعتها على البيئة يعمل على إيقاف أكسدة المركبات الفينولية ولوحظ ظهور لون بني عند قاعدة الأفرع في مزارع الأنسجة ناتج عن النشاط الضوئي Photo activation ويمكن تقليل هذه الظاهرة بحفظ قواعد السوق في الظلام أثناء نموها، أو يمنع نفاذ الضوء بدهان الجوانب الخارجية للأواني المزروعة باللون الأسود حتى مستوى البيئة الغذائية، أو تلف قواعدها بورق ألومنيوم، أو إضافة طبقة رقيقة من الفحم النباتي غير النشط وآجار على سطح البيئة الغذائية. (Rugini, et al., 1986)

جدول (١) الجهد الأسموزي لبعض البيئات الغذائية

البيئة الغذائية	الضغط الاسموزي السكن (بار)	الضغط الاسموزي العناصر الغذائية (بار)
White (1939)	1.46	0.43
Hilderbrandt (1971)	1.46	0.67
Heller (1953)	4.05	0.96
M. S. (1962)	2.20	2.27

٤- مرحلة الزراعة الثانوية (زراعة متكررة)

Sub-culturing

هى زراعة النباتات Plantlets أو الكالس Callus عدة مرات متتالية وعلى فترات متقاربة بهدف زيادة عدد النباتات أو زيادة كمية الكالس بما يتناسب مع حاجة العمل.

ويستخدم في كل مرة نفس البيئة الغذائية ولكنها طازجة. ويفضل عدم تكرار الزراعة الثانوية أكثر من اللازم حتى لا يفقد الجزء النباتي قدرته الذاتية على تكوين النموات. وكان ذلك مؤكدا مع نبات العليق *Convolvulus* وكالس الجذر والقمم النامية لجذور نبات *Isatis tinctoria* حيث تفقد قدرتها على تكوين النموات الجديدة تدريجيا بزيادة عدد مرات الزراعة الثانوية. بينما في حالات أخرى وجد أن نباتات *Lilium longiflorum* و *Chrysanthemum* وأشجار خشبية كثيرة تزداد قدرتها على تكوين النموات الجديدة بتكرار الزراعة الثانوية التي قد تصل إلى عدة سنوات.

الحاجة إلى إجراء الزراعة الثانوية

- ١- عندما تصبح البيئة معرضة للجفاف، أو تحولت من صورة صلبة إلى صورة سائلة لزيادة حموضتها.
- ٢- عندما تملأ النموات الفراغ الداخلي لأواني الزراعة أو عند الحاجة إلى زيادة عدد النباتات أو كمية الكالس.
- ٣- عند ظهور لون بني أو أسود على البيئة نتيجة تجمع مواد تفرزها الأنسجة النباتية خلال الأسابيع القليلة الأولى من الزراعة، وهذه المواد سامة قد تؤدي إلى موت النباتات.
- ٤- عند الرغبة في تغيير اتجاه النمو. ويستلزم لذلك إتمام الزراعة الثانوية في بيئة غذائية جديدة ذات تركيب منشط لنمو الجذور أو السوق ويتم ذلك بتغيير منظمات النمو.

خطوات الزراعة الثانوية

تعقم الأنابيب أو الدوائر المخروطية جيدا من الخارج وعند الفوهة بكحول ٩٦٪، ويفضل تعقيم السدادات تعقيما سطحيا. ثم يستبعد ورق الألومنيوم أو غشاء البولييثين Polythene المستخدم في تغطية فوهة الأواني الزراعية. وباستعمال ملقط معقم يستخرج الجزء النباتي أو كتلة الكالس بحذر من الأنبوبة أو الدوق المخروطي

ويوضع فى طبق بقرى معقم أو بين ورق ترشيح معقم. وباستخدام مشروط معقم تستبعد الأجزاء المتضررة بالقرح Necrotics ثم يقطع الجزء الباقى إلى أجزاء متجانسة ، وتزرع فى بيئة طازجة. وتجرى جميع هذه الخطوات داخل الكابينة المعقمة. وقد تحدث بعض التغييرات فى التكوين الظاهرى للنباتات أثناء الزراعة الثانوية مثل:

١- انخفاض مستوى منظمات النمو الموجودة طبيعياً فى الجزء النباتى مما يؤدى إلى عدم تكوين نموات جديدة. وتستعيد الأجزاء النباتية قدرتها على النمو بإضافة الكاينيتين إلى البيئة. وقد تأكد ذلك فى نبات *Isatis tinctoria*.

٢- زيادة تكرارات الزراعة الثانوية يؤدى إلى إنتاج نباتات مختلفة وراثياً عن نباتات الأم. وقد يرجع ذلك إلى سرعة انقسام الخلايا وعدم انتظام توزيع الكروموسومات أثناء انقسامها. وتؤثر هذه الاختلافات سلباً على الإنتاج التجارى، وإن كانت لها أهمية عند مربي النبات الذى يبحث عن الاختلافات الوراثية. ويختلف عدد تكرارات الزراعة الثانوية باختلاف النبات، فزيادة تكرارات الزراعة الثانوية للأشجار والشجيرات الخشبية يساعد على التخلص من المواد السامة التى تفرزها الأجزاء النباتية فى البيئة.

٣- لا يفضل إطالة الفترة بين تكرارات الزراعة الثانوية أكثر من ٤ - ٦ أسابيع لأنه يؤدى إلى استنزاف عناصر البيئة وجفاف البيئة وتشققها إن كانت صلبة أو زيادة تركيز بعض مكوناتها إن كانت سائلة نتيجة تجميع الماء منها وتراكم المركبات الأيضية السامة المثبطة للنمو التى تفرزها الأجزاء النباتية فى البيئة، وقد تنتقل هذه المواد السامة إلى البيئة إذا تم تجديدها. كذلك يؤدى تأخير الزراعة الثانوية للكاس إلى إضعاف نشاطه وتلف جزء منه ولا يفضل زراعة الكالس الضعيف مرة ثانية لأنه يؤدى إلى مزيد من الضعف .

٥- مرحلة أقلمة النباتات والزراعة فى التربة

النباتات المعملة عادة لها أسطح مغطاة بطبقة رقيقة من الكيوتيكول نتيجة زيادة الرطوبة داخل أوانى الزراعة إلى ٩٠ - ١٠٠٪، وتكون الأوراق عادة رقيقة وغضة

وغير قادرة على التمثيل الضوئى لانخفاض محتواها من البلاستيدات الخضراء
النشطة وزيادة محتواها من البلاستيدات غير النشطة Palissade cells ، واحتواء
خلايا الميزوفيل على مسافات بينية هوائية كثيرة، والثغور Stomata دائمة الانفتاح
وغير قادرة على تأدية وظيفتها الطبيعية، وضعف الأوعية الناقلة التى تربط الجذور
بباقي أجزاء النبات مما يؤدي إلى ضعف حركة المياه داخل النبات. ومضمون ذلك
أن النباتات المعملية هي نباتات ضعيفة لا تستطيع الاعتماد على نفسها فى بناء
غذائها Heterotrophic. ومن السهل أن تفقد قدرا كبيرا من محتواها المائى خلال
الساعات الأولى بعد نقلها إلى البيئة الخارجية مما يعرضها للجفاف والموت. وقد
تنجح بعض النباتات مثل *Saintpaulia*; *Episcia* على تحمل البيئة الجديدة بعد
نقلها من المعمل إلى الصوبة لقدرتها على استكمال نمو الجذر. وقد لا تنجح أنواع
أخرى مثل القرنفل والقنبيل بسهولة ذبولها. لذلك فمن الضروري أقلمة النباتات
المعملية لكي تتحمل الظروف البيئية الجديدة فى الصوبة أو الحقل، وتقوم بالتمثيل
الضوئى بكفاءة تحفظ لها حياتها، وتعمل الثغور بكفاءتها لكي تحافظ على المحتوى
المائى للنبات وتكوين طبقة شمعية مناسبة لحماية الخلايا. والشعيرات الجذرية
للنباتات المعملية عادة ضعيفة ويسهل جرحها وتقطيعها عند تخليصها من البيئة
إذا كانت صلبة تحتوى على آجار. ويجب تخليص الجذور من الآجار لاحتوائه على
سكر يساعد على إصابة النباتات بالكائنات الدقيقة. وتحتاج إلى فترة زمنية حتى
تعوض ما فقدته من الشعيرات الجذرية. وخلال هذه الفترة قد تتعرض النباتات إلى
الذبول والموت. لذلك يفضل تنمية النباتات فى المرحلة الأخيرة من الزراعة الثانوية
على بيئة سائلة تحتوى على ٥٠٪ من مكونات بيئة (MS). ويفضل البعض غمس
النباتات المعملية فى محلول مخفف من الأكسين لتشجيع تكوين ونمو الجذور
عليها. ثم تنقل إلى تربة أو بيت موس ناعم. وقد تعمق التربة بالبخار تحت ضغط
أو بأشعة جاما. ويجب المحافظة على النباتات بعد نقلها إلى التربة وحمايتها من
الإصابة بالأمراض والحشرات.

وتتعرض النباتات العملية إلى فقد قدرتها على المعيشة التكافلية أثناء نموها في المعمل. وتحتاج لفترة زمنية عقب نقلها خارج المعمل حتى تنمو الجذور ويتكون عليها عقد بكتيرية مثل الرايزوبيوم *Rhizobium* والميكوريزا *Mycorrhiza*. وثبت أن إضافة بكتيريا الميكوريزا أثناء فترة التقسية لنباتات البتولا *Birch* و *Leucaena* و *Paxillus involutus* يؤدي إلى تكوين عقد بكتيرية على ٨٠٪ من الجذور وينشط نمو النباتات المحقونة بمعدل ٧٥٪ بالمقارنة بالنباتات غير المحقونة.

وقد يكون من الضروري تعريض النباتات لمعاملة باردة (٥°م) لمدة ٤-٨ أسابيع. وتتم هذه المعاملة في المعمل أو بعد نقل النباتات مباشرة إلى البيئة الخارجية لكسر طور السكون. وكسر طور السكون له أهميته للأبصال والدورات والكورمات وبراعم الأشجار والشجيرات لرفع نسبة نجاح نمو النباتات.

وقبل نقل النباتات إلى خارج المعمل تنزع سدادات الأواني تدريجياً لخفض الرطوبة النسبية داخلها ورفع حيوية النباتات لمساعدتها على التأقلم مع البيئة الخارجية وتكوين طبقة شمعية فوق طبقة الكيوتيكل. ثم تخفف شدة الإضاءة تدريجياً. وبعد نقل النباتات ترفع الرطوبة النسبية بإحداث شبورة *Mist* أو ضباب *Fog* حول النباتات أو زراعتها تحت أغطية من البلاستيك لمدة ١-٢ أسبوع. وقد تستعمل أحياناً رشاشات مائية مع خفض درجة الحرارة والضوء باستخدام التظليل. وقد تنقل النباتات العملية إلى صوان كبيرة مقسمة إلى حجرات مربعة تحتوى على تربة، ثم تغطي بالبلاستيك للمحافظة على المستوى المرتفع من الرطوبة على أن يتم رفع الأغطية تدريجياً حتى تتم أقلية البادرات. وتوجد صوان بلاستيك تسمى *Plug plate* تحتوى على ٤٠٠ حجرة تملأ ببيئة صناعية مثل البيت موس مضافاً إليه مواد منشطة لتكوين الجذور. والبيت موس قادر على الانتفاخ بعد ترطيبه بالماء ويعمل على تثبيت النباتات. وتوضع هذه الصوانى فى صوبة نصف معقمة وتستخدم فيها رشاشات للمحافظة على الرطوبة النسبية المرتفعة. وبعد اكتمال نمو الجذور تبدأ السوق الحديثة فى النمو، حينئذ تنقل النباتات إلى الصوبة ويزرع كل نبات على حده فى التربة. وتنجح هذه الطريقة فى زراعة عقل ساقية متكونة فى المعمل لنباتات *Rhododendron* و *Gerbera*.

زراعة الأجنة الجنسية

Sexual (Zygotic) embryos

أهمية زراعة الأجنة الجنسية

الأجنة الجنسية (الزيجوتية) ناتجة من اندماج محتويات حبة اللقاح مع محتويات البويضة. وتفصل الأجنة في أى مرحلة من مراحل نضج البذرة لزراعتها في المعمل. ولزراعة الأجنة أهمية فيما يلى:

١- التغلب على حالة عدم إنبات البذور

تستخدم زراعة الأجنة لبعض الأنواع النباتية التى يستحيل إنبات بذورها فى الحقل مثل القلقاس *Colocasia esculenta* والنوز *Musa balbisiana*

٢- التغلب على ظاهرة السكون فى البذور

قد يكون صلابة غطاء البذرة سببا فى منع أو تقليل نفاذ الماء والأكسجين داخل البذرة. وإنبات مثل هذه البذور قد يكون بطيئا جدا وقد يمتنع تماما. وتنبت هذه البذور بعد إزالة غطائها. وفصل الأجنة غير الناضجة وزراعتها فى وسيلة للتغلب على ظاهرة السكون ومن أمثلة ذلك الورد البلدى والتفاح ونخيل الزيت والأيريس.

٣- التغلب على ظاهرة عدم التوافق

يتم فصل الأجنة قبل اكتمال نضجها ثم زراعتها فى المعمل. ومن أمثلة ذلك الهجن الناتجة من بعض الأنواع التابعة لجنس الفاصوليا *Phaseolus* وأنواع اللبلى والكتان والقطن والطماطم والأرز والشعير.

٤- إنتاج نباتات متجانسة

بالزراعة المعملية لأجنة أحادية العدد الكروموسومى تنتج نباتات أحادية، وبمضاعفة عدد الكروموسومات بالكولشسين تنتج نباتات ثنائية متجانسة خصبية.

٥- إكثار الأجنة ثلاثية العدد الكروموسومى

تطبق زراعة الأجنة الجنسية عبر الناضجة لإكثار نباتات ثلاثية العدد الكروموسومى، وهى نباتات تعطى بذورا عقيمة غير مكتملة النضج وفيها الإندوسبرم غير مكتمل التكوين، ومن أمثلتها الشعير والشوفان والجويدار. وتنتج النباتات الثلاثية من التهجين بين نباتات ثنائية ونباتات رباعية.

٦- التغلب على ظاهرة الموت المبكر للأجنة

قد يتوقف مبكرا انتقال الماء والعناصر الغذائية للأجنة غير الناضجة ويسبب ذلك موت الأجنة مبكرا. ولوحظت هذه الظاهرة فى مجن بين أنواع ذات النواة الحجرية مثل الخوخ والكريز والمشمش والبرقوق. ولذلك تستخدم الزراعة المعملية الأجنة للتغلب على ظاهرة الفشل المبكر لنمو الجنين فى الحقل.

طرق فصل الأجنة من بعض البذور

تستخدم الأجنة غير الناضجة Immature embryo فى الزراعة المعملية لإكثار النباتات التى تنتج بذورا يموت فيها الجنين مبكرا. لذلك يفضل فى هذه الحالة فصل الأجنة مبكرا من البذور، مع الحرص بعدم إحداث أى ضرر للجنين أثناء فصله، ثم زراعته فى بيئة غذائية مناسبة. وتزرع الأجنة الناضجة Mature embryo للتغلب على ظاهرة السكون. وفصل الأجنة من بذور تامة النضج بسهولة وتزرع فى بيئة غذائية بسيطة مضافا إليها آجار وسكر وعناصر معدنية.

وتعقم الأسطح الخارجية لكل من البذور الناضجة أو غير الناضجة بالطريقة العادية للتعقيم السطحي. بالنسبة للبذور الناضجة تشق القصرة لكي يصبح الجنين ظاهرا ويسهل فصله من الفلقات. أما بالنسبة للأجنة غير الناضجة فيتم فتح غلاف الثمرة بحرص حتى تصبح البويضات المخصبة (أجنة غير ناضجة) وقد تحدد موقعها بدقة ثم تفصل بحرص. و يراعى عدم جرح الأجنة عند فصلها حتى لا تفشل فى نموها أو تكون كالس. ويفضل استخدام ميكروسكوب عند فصل الأجنة إذا كانت صغيرة أو أنسجتها ضعيفة فى وجود مصدر ضوئى بارد (فلوروسنت) مع استخدام شفرة حادة و إبرة حقن. والآتى عرض لفصل بعض الأجنة :

١- فصل جنين الشعير embryo Barley ، حيث تفصل الحبوب من السنبله ، ثم تعقم وتشطف بماء مقطر، ثم ترص فى أطباق بترى بحيث يكون ظهر الحبة المحتوى على الجنين لأعلى. ثم تزال المنطقة القمية للثمرة ويستبعد غلاف الحبة وغطاء البذرة لكي يصبح الجنين حرا . عندئذ يفصل الجنين بواسطة مشروط ويثبت على بيئة صلبة.

٢- فصل جنين الكريز Cherry embryo ، حيث تنزع البذور الصلبة من ثمار الكريز وتوضع فى إناء به ماء للكشف عن حيويتها، فالبذور الجيدة تغوص وترسب فى القاع. وتجمع البذور الجيدة ثم تعقم تعقيما سطحيًا. وتشق البذرة المعقمة بحيث يصبح الجنين مرئيا. ثم تستخرج الأجنة بحرص باستخدام ملقط مدبب الطرف ثم تنقل مباشرة على بيئة غذائية صلبة.

٣- فصل جنين الليلي Lily embryo ، تجمع الثمار بعد ٤٠-٦٠ يوما من الإخصاب وتعقم سطحيا بكحول إيثايل ٩٦٪. ثم تفصل البذور وتوضع فى إناء يحتوى على ماء معقم لمنع جفافها. ويزال غطاء البذرة بكشطه بمشرط حتى يصبح الإندوسبرم مرئيا. ثم يشق غطاء البذرة طوليا فى اتجاهات متعددة. ويفصل الجنين بواسطة دفعه إلى خارج الإندوسبرم ويزرع مباشرة عقب فصله فى بيئة غذائية صلبة.

عوامل إنجاح زراعة الأجنة الجنسية

١- تختلف قدرة الأجنة على النمو فى المعمل باختلاف الصنف والنمط الوراثى Genotype والعمر الفسيولوجى، لذلك يجب التعرف إلى خصائص الأجنة ومرحلة النمو المناسبة لفصلها. فقد تنجح بعض الأجنة إذا زرعت فى المعمل بعد اكتمال نضجها ولا تنجح إذا زرعت فى مرحلة مبكرة من النضج. ويفضل فصل الجنين ملتصقا به جزء من الإندوسبرم أو جزء من السويقة الجنينية Hypocotyl فى حالة صغر عمر الجنين بصورة واضحة.

٢- ينمو الجنين جيدا إذا كانت الفلقات أكثر نضجا وممتلئة بالمواد الغذائية المخزنة. أما بالنسبة للبذور التى تحتوى فلقاتها على مسيبات السكون فيجب إزالة الفلقات قبل زراعة الأجنة. وأحيانا تعامل نباتات الزينة المزهرة بالجبرلين قبل فصل الأجنة وهذا يؤدى إلى زيادة حجمها وسهولة فصلها.

٣- يؤدى تحسين الظروف البيئية المحيطة بنبات الأم إلى نمو جيد للأجنة المفصلة منها.

٤- تزرع الأجنة غير الناضجة بعد فصلها مباشرة على بيئة تحتوى على نسبة مرتفعة من السكر.

٥- يراعى عدم تلوث الأجنة وعدم الإضرار بها أثناء فصلها من البذور خصوصا إذا كانت بذورا صلبة.

٦- الأجنة المفصلة عمر ٧- ١٤ يوما تنمى فى ظلام قبل نقلها إلى الضوء لتشجيع تكوين الكلوروفيل.

٧- تحتاج مزارع الأجنة للأوكسيجين بتركيز أعلى من تركيزه فى الهواء الجوى.

٨- درجة الحرارة المثلى لنمو الأجنة تختلف باختلاف النوع النباتى. وعادة تحضن الأجنة بعد زراعتها عند ٢٢- ٢٨°م. بينما يستلزم تحضين أجنة بعض الأنواع النباتية مثل الليلي Lily عند ١٧°م، على أن يبقى نبات الأم لمدة

٤-٦ أسابيع عند ٥-٩°م للحصول على نمو جيد للأجنة. وقد يستلزم تعريض الأجنة لمعاملة باردة (٤°م) لكسر سكونها.

البيئة الغذائية المناسبة لنمو الأجنة

تحتاج الأجنة الناضجة وغير الناضجة إلى بيئة صلبة يتوفر فيها العناصر الكبرى والصغرى والسكر. وتكون حموضتها ٦-٥ pH. وتستخدم بيئات عديدة مثل بيئة (1976) Monnier لزراعة أجنة نبات *Capsella bursa-pastoris* وأنواع نباتية أخرى، حيث تحتوي على أيونات أمونيا وبوتاسيوم وسكروز. وقد يكون لوجود الجلوكوز والفركتوز في البيئة أهمية أحيانا. كما أن السكروز له أهمية كمصدر للطاقة ويساعد على خفض الضغط الأسموزي للبيئة خصوصا مع الأجنة غير الناضجة. وتنمو الأجنة الناضجة على بيئة تحتوي على ٢-٣٪ سكروز، بينما تحتاج الأجنة غير الناضجة إلى بيئة تحتوي على ٨-١٢٪ سكروز. ولا تضاف منظمات النمو إلى بيئة الأجنة لاحتواء الأجنة على ما يكفيها منها. وإضافة منظمات النمو للبيئة يؤدي إلى تكوين كالس. ويفضل إضافة الجبرلين أحيانا لبيئة الأجنة المقصورة من بذور ساكنة لدوره الهام في كسر السكون. وقد يستلزم إضافة بعض الفيتامينات لمزارع الأجنة مثل الجلوتامين Glutamine كمصدر هام للنيتروجين وله أهمية خاصة لنمو الأجنة غير الناضجة، كما أن إضافة لبن جوز الهند والكازين Casein hydrolysate ومستخلص المولت لها أهميتها أيضا لنمو الأجنة غير الناضجة.



الباب الرابع

البيئة الغذائية Nutritional Medium

صور البيئات الغذائية Forms of media

١- بيئة صلبة Soli medium

هى بيئة تحتوى على آجار أو جيلاتين أو Biogels لإكسابها قواما هلاميا. ويفضل استخدام آجار نقى مثل Difco- Nobel. ويضاف الآجار بتركيز ٠,٦ - ١٪ (وزن/ حجم) أو الجيلاتين بتركيز ١٪ (وزن/ حجم).

٢- بيئة سائلة Liquid medium

هى بيئة لا تحتوى على آجار ويفضلها كثير من الباحثين فى الزراعة العملية بدلا من البيئة الصلبة.

٣- بيئة ثنائية المظهر Double Phase medium

الاستعمال المنفرد للبيئة الصلبة أو السائلة فى الزراعة العملية قد يظهر التزجج Verification لذلك تستخدم بيئة مزدوجة المظهر. وتجهز هذه البيئة بصب بيئة تحتوى على آجار فى قاع وعاء الزراعة، ثم تزرع عليها المادة النباتية، ثم يصب فوقها بيئة سائلة تحتوى على نفس مكونات البيئة الصلبة ولكنها بدون آجار. وبذلك تكون المادة النباتية متواجدة بين بيئة صلبة وبيئة سائلة يحتويان على نفس المكونات الغذائية. وبهذه الطريقة يسهل تغيير الجزء السائل من البيئة كلما تطلب ذلك ببيئة سائلة أخرى معاملة ولكنها طازجة.

مقارنة بين البيئة الصلبة والسائلة

- ١- بعض الأنواع النباتية تنمو جيدا فى بيئة سائلة مثل نباتات العائلة -Brome tiaceae، بينما ينمو البعض الآخر بصورة جيدة فى بيئة صلبة.
- ٢- تحتاج الأجزاء النباتية المزروعة فى بيئة سائلة إلى إمداد جيد من الهواء نظرا لانغماسها فى البيئة. لذلك تثبت الأوعية المزروعة على هزاز كهربائى لرجها بالسرعة المطلوبة حتى لا تصاب الأجزاء النباتية بالضرر.
- ٣- انخفاض معدل استفادة الجزء النباتى أو الكالس من مكونات البيئة الصلبة، حيث إن سطح الجزء النباتى الملامس للبيئة الصلبة هو المستفيد فقط. بينما تستطيع جميع أسطح الجزء النباتى المنغمس فى البيئة السائلة امتصاص العناصر الغذائية ومنظمات النمو لوجود تماس مباشر مع البيئة.
- ٤- تتركز الإفرازات Exudates الخارجة من الأجزاء النباتية فى مكان واحد على البيئة الصلبة مما يؤدى إلى إحداث الضرر أو الإطفار للنموات الجديدة. بينما تنتشر هذه الإفرازات فى البيئة السائلة بالرج، وبذلك يكون لها تأثير أقل ضررا على النموات.
- ٥- عدم استفادة الجزء النباتى المنغمس تحت سطح البيئة الصلبة من تبادل الغازات. بينما الرج المستمر للبيئة السائلة يساعد على تبادل الغازات واستفادة الجزء النباتى المنغمس فيها من مكونات البيئة الغذائية.
- ٦- صعوبة تخليص الجذور من البيئة الصلبة سائلة بدون أضرار، بينما يسهل تخليصها من البيئة السائلة.
- ٧- سهولة تسجيل مقاييس النمو وسرعة التنفس للنموات النامية على بيئة سائلة.
- ٨- ظاهرة الاستقطاب Polarization الناتجة عن تأثير الجاذبية الأرضية تكون واضحة على الكالس المنزوع على بيئة صلبة، بينما ليس لها تأثير واضح على الكالس المنزوع فى بيئة سائلة.
- ٩- عدم انتظام انتشار الضوء بين النباتات النامية على بيئة صلبة يؤثر على نموها، بينما يكون انتشار الضوء أفضل فى حالة البيئة السائلة.

١٠- يكون انقسام الخلايا وتكثفها ونموها أسرع على البيئة السائلة.

حركة البيئة السائلة

١- بيئة سائلة ساكنة (Stationary liquid medium (Immobile media)

هي طريقة شائعة الاستعمال فى إنتاج المواد الأيضية الثانوية -Secondary metab-olites وفى زراعة البروتوبلاست. وتكون البيئة السائلة ساكنة لتحسين انقسام ونمو الخلايا ومنع إحداث الضرر بها. وتساعد على انتخاب الطفرات والهجن الناتجة من اندماج البروتوبلاست بسهولة.

٢- بيئة سائلة متحركة (Agitated liquid medium)

يساعد استمرار حركة البيئة السائلة على وجود تماس مباشر بين سطح الجزء النباتي مع البيئة، وتعظيم استفادته من تجانس انتشار العناصر الغذائية والغازات فى البيئة، واختفاء أعراض نقص العناصر واختناق الجذور، وتساعد حركة البيئة على انتشار الإفرازات السامة فى البيئة وعدم تركيزها فى منطقة الجذور. ويستخدم هزاز كهربائى أو مقلب مغناطيسى لتحريك البيئة السائلة. ويثبت على الهزاز دوارق مخروطية كبيرة، يحتوى كل منها على ٢٠٪ من سعته بيئة سائلة، ويعمل الجهاز بسرعة ٥٠ - ١٠٠ دورة/ الدقيقة. بينما يثبت على المقلب المغناطيسى دوارق مخروطية سعة ١٥٠ مللى، يحتوى الواحد منها على ١٥ مللى بيئة سائلة، ويعمل بسرعة ٢٥٠ دورة/ دقيقة. وللحصول على نتائج ممتازة يجب تجديد البيئة كل ١٠ أيام تقريبا.

٣- بيئة سائلة دوارة

تستخدم فى هذه الطريقة عجلة دوارة يثبت عليها دوارق مخروطية محتوية على أجزاء نباتية منزوعة فى بيئة سائلة. وتدور العجلة بسرعة دورة واحدة/ دقيقة مما

يؤدي إلى انتقال البيئة الغذائية من طرف الدورق إلى الطرف الآخر تاركة الجزء النباتي منعصما في البيئة الغذائية، ثم في تماس معها، ثم معرضا للهواء مما يتيح فرصة لتبادل الغازات. وتستخدم هذه الطريقة في زراعة الكالس وعديد من الأنواع النباتية.

ماكينات هزازة ودوارة

تستخدم ماكينات هزازة Shakers ودوارة Rotating machines لإسراع نمو الخلايا والأنسجة النباتية والكورمات الأولية (الكريعات) Protocorms والمرستيمات المزروعة في بيئة سائلة. ويستمر تشغيل هذه الماكينات لتنشيط تبادل الغازات ما بين الأكسجين وثنائي أكسيد الكربون وتقليل تأثير الجاذبية الأرضية وتجانس توزيع العناصر الغذائية والهرمونات وانتشار الإفرازات السامة في البيئة السائلة. ومن هذه الماكينات:

(أ) ماكينات بطيئة الحركة

منها ماكينات دوارة بطيئة الحركة مثل عجلة أوركيد Orchid wheel وماكينة ستيوارد Steward machine، وتحرك بسرعة ٢ - ٤ دورة/ دقيقة، ومنها ماكينات دوارة أكثر سرعة مثل الجهاز الهزاز الدوار Rotary shakers، ومنها ماكينات تجمع بين النوعين السابقين. وهذه النوعية من الماكينات تسمح للأنسجة المرستيمية أو الكورمات الأولية للأوركيد باستمرار البقاء في البيئة السائلة. وتختلف هذه الماكينات في درجة انحدار المنضدة المثبت عليها أواني الزراعة. فمثلا ميل منضدة عجلة الأوركيد ٤٥° بينما ميل منضدة ماكينة ستيوارد ١٢ - ١٥°. وتستخدم مع ماكينات ستيوارد دوارق زجاجية كبيرة الحجم مستديرة القاع ذات زوائد أنبوبية في المحيط القاعدى لها تساعد على تثبيتها. وتستخدم مع عجلة الأوركيد أنابيب اختبار توضع في سلة أنابيب أو دوارق مخروطية ١٠٠ مليلتر أو دوارق أصغر منها تثبت بمشدات خاصة Clamps.

(ب) دولاب دوار Rotator wheel

يُثبت عليه دوارق مخروطية زجاجية ذات زوائد Nipples أنبوبية في المحيط القاعدي لها. وتزرع الأجزاء النباتية في الزوائد الأنبوبية. ويحتوى الدورق الواحد سعة لتر على عشرة زوائد أنبوبية. ويحتوى الدورق ٢٥٠ مليلتر على ثمانية زوائد أنبوبية. وتساعد حركة دوران الدولاب بمعدل ١-٢ دورة/ الدقيقة على انتقال البيئة السائلة من جهة إلى أخرى داخل الزوائد الأنبوبية وبذلك يتحسن تبادل الغازات فيها خصوصا إذا كان غطاء الأنبوبة من القطن. وتستخدم هذه الطريقة بنجاح فى زراعة أنواع نباتية مختلفة.

(ج) هزاز بسطح مستو Platform shaker

يستخدم هذا الجهاز لتفكيك الأجزاء النباتية إلى خلايا منفردة وتنشيط نموها وتكاثرها. ويستخدم لهذا الجهاز دوارق سعة ١٠٠-١٠٠٠ مللى تثبت بكلبيات على السطح المستوى للجهاز. وتعتبر الدوارق سعة ١٠٠ مللى المحتوية على ٢٠-٢٥ مللى بيئة أو الدوارق سعة ٢٥٠ مللى المحتوية على ٧٠ مللى بيئة هى الأمثل لمعظم التجارب، على أن تغلق فوهة الدورق بسدادة قطن أو ورق ألومنيوم. ويعمل الجهاز بسرعة ٣٠-١٥٠ دورة/ دقيقة.. ويجب أن تكون الحركة تتابعية مدارية منتظمة تقدر من ٢-٤ سم. ويجب تأمين استمرار عمل الجهاز بدون انقطاع نتيجة إخفاق فى ميكانيكية الجهاز أو قطع التيار الكهربائى. ويجب توفير الظروف المناسبة للنمو مثل الحرارة والعناصر الغذائية وغيرها، وتتوفر الآن دوارق تتحمل الحرارة ومزودة بمدخل ومخرج لتسهيل إضافة بيئة طازجة وإخراج البيئة القديمة فى أى وقت أثناء التشغيل. وتوجد أنبوبة لتبادل الغازات يمرر فيها الهواء الداخل للدورق خلال مرشحات تعقيم لمنع التلوث ويساعد على انتشار الخلايا بانتظام فى البيئة الغذائية. كما يوجد مدخل لقياس حموضة البيئة لتجنب التغيرات المحتمل حدوثها أثناء فترة التجربة.

معلق الخلايا Cell suspension

تحضير معلق الخلايا

يحضر معلق الخلايا بزراعة خلية فردية أو مجموعة من الخلايا فى بيئة سائلة لا تحتوى على آجار بهدف تفكيك وإكثار الخلايا. ويمكن المساعدة فى تفكيك الخلايا بالضغط الخفيف على الجزء النباتى الغض أو أجنة أو كالس باستخدام قضيب زجاجى ثم زراعتها فى بيئة سائلة. وتستخدم دوارق مخروطية لها زوائد أنبوبية جانبية تحتوى على بيئة سائلة. وتزرع الخلايا النباتية أو أجزاء من الكالس داخل الزوائد الأنبوبية. وتثبت الدوارق على قرص دوار يتحرك بسرعة دورة واحدة/ الدقيقة. وبذلك تتكاثر الخلايا ويزداد عددها فى البيئة بعد فترة من الحركة المستمرة (Steward and Shantz, 1956). ويستخدم فى ذلك جهاز هزاز ذات سطح مستو. وتنمو الخلايا وتتكاثر مع استمرار رج البيئة السائلة أثناء فترة الحضانة التى تستغرق ٢١-٢٨ يوما مع المحافظة على تبادل الغازات وتجانس توزيع الخلايا فى الوسط الغذائى. لذلك فإن دراسة مكونات البيئة السائلة والمحافظة على حموضتها فى اتجاه نقطة التعادل لها أهمية كبيرة فى تسهيل تجزئة وتفكيك خلايا الكالس المتجمعة وتجانس انتشار الخلايا وتماسها المباشر مع البيئة السائلة.

تثبيت الخلايا فى البيئة السائلة

يمكن تنشيط النمو فى بيئة سائلة بدون استخدام أية وسيلة للتثبيت، حيث تعمس الخلايا والأنسجة فى بيئة غذائية مع استمرار الرج بهزاز كهربائى لتوفير التهوية الجيدة. وفى حالة عدم توفير جهاز الرج يمكن استخدام إحدى الطرق الآتية لتثبيت الخلايا:

١- استخدام ورق ترشيح خالٍ من الرماد Ashless filter paper

تعلق كبار من ورق الترشيح فوق سطح بيئة سائلة غير متحركة. ثم تثبت الأجزاء النباتية أو التجمعات الخلوية المتعددة على السطح العلوى لورقة الترشيح. ويساعد ورق الترشيح على إمداد الخلايا أو الجزء النباتي بالبيئة الغذائية ويحافظ على إبقائها في الهواء فيسهل لها تبادل الغازات.

٢- استخدام قطع اسفنج Viscose sponge تحت ورق ترشيح

تستخدم كبار من ورق الترشيح كحامل للمادة النباتية. و يضاف قطعة اسفنج تحت ورقة الترشيح. وفي هذه الطريقة يمكن إعادة استخدام المواد المستعملة، وإجراء الزراعة الثانوية بعد تغيير البيئة الغذائية وبدون تغيير الإناء المستخدم في الزراعة. وتسهل هذه الطريقة فحص النموات واستبعاد غير الصالح منها، ويمكن نقل البادرات الناتجة بسهولة إلى التربة كما تتميز بأنها تحتاج إلى كميات أقل من المواد الغذائية.

٣- الغمس Embedding

تغمس الخلايا أو البروتوبلاست في مركبات مثل جيل بوليمر Polymeric gel أو جيل الجينات الكالسيوم Calcium alginate gel أو Agar أو Agarose. ويعتبر الجينات الكالسيوم من المركبات غير السامة بينما Polyacrylamide غالبا تكون سامة ولا يفضل استخدامها.

٤- الاصطياد الداخلى Entrapment

تستخدم في هذه الطريقة مناخل أو أغشية ليفية مسامية Hollow-fiber membrane أو فومات مسامية Pre-formed plastic foams أو صوف زجاجى Glass wool أو صوف صخرى Rock wool. كذلك تستخدم ألياف أنبوبية مصنوعة

من خلاات السليلوز Cellulose acetate أو سليكون متعدد الكربونات Silicone polycarbonate. وترتب هذه الأغشية على هيئة حزم متوازية عند طرف الألياف الأنبوبية المحتوية على الخلايا، فيتم اصطياد الخلايا في المسافات البينية للأغشية اللدنية وتتم البيئة الغذائية السائلة في فراغات الألياف. وتستخدم شبكة من مادة Polyurethane foam لاصطياد الخلايا حيث تنمو في صورة تجمعات خلوية مع الاحتفاظ بحيويتها كاملة.

٥- التثبيت على كرات زجاجية

تعلق الخلايا على كرات زجاجية داخلها فجوة هوائية تساعد على الطفو فوق البيئة السائلة.

الزراعة الثانوية لمعلق الخلايا

عندما يصل أحد العناصر المكونة للبيئة الغذائية إلى مرحلة الاستنزاف يصبح هو المتسبب في انخفاض سرعة نمو وانقسام الخلايا، وتكون هذه الفترة هي المناسبة للبدء في الزراعة الثانوية المتكررة للخلايا. وتتم الزراعة الثانوية باستخدام ماصات أو حقن لنقل أحجام محددة من معلق الخلايا إلى بيئة سائلة طازجة تحتوى على نفس المكونات للبيئة السابقة. ويفضل أخذ الكميات المطلوب زراعتها من السطح العلوى لمعلق الخلايا.

مراحل انقسام الخلايا المعلقة

١- مرحلة تلكؤ الانقسام The lage phase

يحدث عقب الزراعة فى بيئة سائلة دخول الخلايا فى مرحلة سكون حركى مع زيادة نشاط فيولوجى. وتبدأ هذه المرحلة بسلسلة من عمليات التمثيل الغذائى تنهى بعدها الخلايا للانقسام الميتوزى. ويحدث أثناء مرحلة التمثيل

الغذائى زيادة القدرة الاختزالية وإنتاج مركبات ATP والكربوهيدرات كمصدر للطاقة. لذلك يعتبر إضافة السكر للبيئة هاما جدا كمصدر للطاقة. حيث يتم أكسدة السكر بواسطة دورة تحليل الجلوكوز Glycolysis ودورة البنتوز Pentose Phosphate pathway ودورة حمض ترأى كربوكسيليك Tricarboxylic acid وتزداد سرعة تمثيل البروتينات والأحماض النووية. كما تتأثر بشدة حالة ثبات مستوى إنزيم mRNAs بما تحتويه البيئة الغذائية من الأكسجين ونشاط إنزيم Phenylala-nine ammonia lyase.

٢- مرحلة انقسام الخلايا Cell division phase

فى هذه المرحلة تبدأ الخلايا فى الانقسام وتستمر فى الانقسام حتى يصبح واحدا أو أكثر من عناصر البيئة هو السبب فى ببطء أو توقف الانقسام. وفى تجربة زرعت خلايا القفة النامية لنبات الخرشوف Jerusalem artichoke وحضنت عند ٢٥°م. وبعد سبعة أيام زاد عدد الخلايا بمقدار ١٠ أضعاف العدد الذى بدأ به. وخلال هذه الفترة زادت كمية الأكسجين المستهلك فى التنفس، وزاد ثبات الحمض النووى RNA خلال ثلاثة الأيام الأولى من الزراعة العملية، وزادت سرعة تمثيل البروتين نسبيا وانخفاض المواد الثانوية الممتلئة مع تغير بسيط فى حجم الخلايا وتميزت باحتوائها على فجوات صغيرة ولم يحدث لها تكشف.

٣- مرحلة الثبات العددي Stationary-phase

تنخفض بوضوح سرعة انقسام الخلايا عندما يصل كثافتها مرحلة الثبات العددي فى البيئة السائلة، وينخفض تنفسها وتمثيل الحمض النووى RNA وتمثيل البروتين مع زيادة عدد الخلايا المحتوية على فجوات عسارية. ويرتبط توقف الخلايا عن الانقسام بزيادة تجمع بعض المركبات الأيضية الثانوية مثل بعض القلويدات والأنثوسيانينات والفينولات والأنثراكوينون. وثبت أن ظهور

المركبات الأيضية الثانوية يكون مصحوبا بتكشاف محدود لخلايا نباتات العائلة الباذنجانية Solanaceae خصوصا إذا لم تستبدل البيئة الغذائية ببيئة حديثة التجهيز. فمثلا إذا لم تجدد زراعة الكالس الخاص لنباتى *Atropa belladonna* و *Hyoscyamus niger* بعد نهاية أربعة الأسابيع الأولى من الزراعة قد يكون ذلك سببا في تنشيط نمو الجذور والسوق وتكوين نموات تشبه الأجنة خلال الأسابيع الأربعة التالية. وفي المرحلة الأخيرة من طور الثبات العددي للخلايا Late stationary-phase قد تتكون الأجنة وتتكون مركبات Tropane alkaloids مثل Atropine وكثير من مركبات Hyoscyamine و Scopolamine. وتتجمع هذه المركبات في التكوينات الخلوية المتكشفة وقد تتجمع في التجمعات الخلوية البسيطة. وقد تظهر بعض التكشفات الخلوية وبعض الأعضاء النباتية بعد أن تصبح العناصر الغذائية وقد قاربت على النفاذ من البيئة الغذائية. ويتأثر ظهور هذه التكشفات بتمثيل مواد ثانوية مشابهة لما تنتجها النباتات الكاملة. وتعد هذه ظاهرة طبيعية تبين أن سلامة تكوين المواد الأيضية الثانوية مرتبط بسلامة التركيب البنائي للخلايا.

الكثافة الحرجة للخلايا المعلقة

تعرف الكثافة الحرجة للخلايا بأنها أقل كثافة من الخلايا يجب حقنها في البيئة السائلة لكي تبدأ في النمو والانقسام بصورة جيدة. فقد يؤدي زراعة عدد قليل من خلايا الكالس في بيئة سائلة إلى فشلها في استعادة قدرتها على الانقسام، وقد تنمو هذه الخلايا وتنقسم بسرعة إذا زرعت بكثافة أكبر في بيئة غذائية معادلة. لذلك فإن تقدير الكثافة الحرجة للخلايا في البيئة السائلة عند بدء التجربة له أهمية. وتنتهي الخلايا سريعا للانقسام عقب زراعتها في البيئة السائلة، ويزداد عددها بتعدد انقسامها حتى ترتفع كثافة الخلايا في المعلق. عندئذ تبدأ سرعة انقسام الخلايا في الانخفاض تدريجيا نتيجة تراحمها. ويمكن أن يكون واحد

أو أكثر من عناصر البيئة الغذائية هو المحدد لهذا الانقسام والوصول إلى مرحلة الثبات العددي للخلايا Stationary phase. وعند هذه المرحلة يستلزم إجراء الزراعة الثانوية Sub-culturing بهدف زيادة عدد الخلايا بما يكفي واحتياج العمل. ويمكن رسم خط بياني يوضح العلاقة بين معدل نمو الخلايا أثناء فترة التحضين ابتداء من فترة ما بعد الزراعة مباشرة حتى الوصول إلى مرحلة ثبات عدد الخلايا. ويفضل إجراء الزراعة الثانوية بأخذ عينات من معلق الخلايا قبل وصولها إلى مرحلة الثبات أو عقب وصولها إلى هذه المرحلة مباشرة بدون تأخير للمحافظة على حيوية الخلايا وقدرتها على النمو والتكاثر. وتحديد مرحلة الثبات العددي للخلايا يكون وفقا للعدد الأولي للخلايا عند بدء الزراعة وسرعة نموها. ويفضل أن يكون التركيز الأولي للخلايا ما بين $10^5 - 2.5 \times 10^6$ خلية/سم³. ويزداد هذا التركيز أثناء فترة الحضانة فيصبح $10^7 - 4 \times 10^8$ خلية/سم³. و يعنى ذلك أن جميع الخلايا انقسمت بمعدل 4-6 مرات في فترة 18-25 يوما. وإذا تم سحب عينة من الخلايا لإعادة زراعتها فإن الفترة اللازمة لبلوغها التركيز المذكور تصل إلى 6-9 أيام فقط.

تقدير عدد الخلايا المعلقة

لقياس عدد الخلايا في السنتيمتر المكعب يستلزم إضافة حجم واحد من معلق الخلايا إلى حجمين من محلول ٨٪ ثالث أكسيد الكروميك Chromium trioxide . ثم ترفع درجة حرارة المحلول إلى 70°C لمدة ٢-١٥ دقيقة. وتحدد هذه الفترة الزمنية تبعاً لمرحلة نمو الخلايا في البيئة الغذائية. بعدها يترك الخليط ليبرد ثم يهز بقوة لمدة ١٠ دقائق في جهاز هزاز. ويفضل إضافة البكتين إلى معلق الخلايا للحصول على نتائج أفضل. ويخفف محلول الخلايا بمعدل مناسب لكي تصبح الخلايا سهلة العد والفحص تحت المجهر. ويتطلب الفحص المجهرى استخدام شرائح زجاجية تحتوي على ثلاث قنوات يصل عمقها إلى ١٢٠٠ ميكرومتر حيث يكون هذا العمق مناسباً لمعظم خلايا الأنواع النباتية المختلفة. وتنقل عينة من معلق الخلايا إلى

الشريحة وتترك فترة لكى تهدأ الخلايا وتثبت. ويمكن تحديد عددها تحت المجهر بقوة تكبير ١٠٠ مرة. ثم يتم حساب عدد الخلايا فى قناة واحدة تختار عشوائيا من القنوات الثلاث بالشريحة. ويكرر ذلك لخمس شرائح تحتوى على عينات من نفس معلق الخلايا تحت الاختبار. ويجب أن تحتوى القناة الواحدة على ٥ - ١٠ خلايا، فإذا كان حجم القناة الواحدة يساوى ٠,٩٩ ميكرو لتر (µl) فإنه يمكن حساب عدد الخلايا على أساس واحد سنتيمتر مكعب.

توجيه الخلايا المعلقة نحو النمو والتطور

تنشط سلسلة من العمليات الحيوية والفسولوجية أثناء نمو الخلايا. فتمتص الخلايا حاجتها من البيئة الغذائية وتقوم أيضا بإفراز مواد أيضا. وتتأثر البيئة بكل من ظاهرتي الامتصاص والإفراز. ويتأثر بالتالى سرعة انقسام الخلايا واتجاه نموها. ويمكن توجيه الخلايا إلى النمو والتطور بتغيير المحتوى الغذائى للبيئة. والعلاقة المتوازنة للأكسين والسيبتوكاينين فى البيئة لها تأثير على كشف الكالس. فزيادة تركيز السيبتوكاينين (KIN) بالنسبة للأكسين (IAA) فى البيئة الغذائية يؤدى إلى كشف ونمو الأفرع من الكالس. وزيادة تركيز الأكسين بالنسبة للسيبتوكاينين يشجع تكوين الجذور. والتركيزات غير المتوازنة من السيبتوكاينين والأكسين يؤدى إلى اضطراب النمو أى لا يتكشف منه نموات خضرية ولا جذور. وهذه هى القاعدة العامة لعدد كبير من الأنواع النباتية لتوجيه النمو نحو تكوين نموات خضرية أو جذرية، وتختلف الأنواع النباتية فى احتياجاتها المثلثى للأكسينات والسيبتوكاينينات، كذلك المكونات الأخرى للبيئة الغذائية لها أهمية فى تحديد مسار النمو. وفى الواقع أن ميكانيكية تأثير منظمات النمو لم تتضح بعد. ويعتمد نشاط الخلايا الناتج عن تواجد منظمات النمو والمكونات الأخرى بالبيئة الغذائية على العمر الفسولوجى للخلايا المزروعة وأصل النسيج المأخوذ منه الجزء النباتى وطول مدة بقاء الخلايا فى المعمل (Skoog and Miller, 1957).

المكونات الرئيسية للبيئة الغذائية

تحديد المكونات الرئيسية للبيئة الغذائية

تحتوى البيئة الغذائية على حوالى ٢٠ مركبا. وتتكون أساسا من ماء وسكر وعناصر معدنية ومنظمات نمو (جدول ١). ويفضل الرجوع إلى الدراسات السابقة لتحديد البيئة المناسبة للنبات تحت الدراسة بدلا من إجراء سلسلة اختبارات لتحديد البيئة وتركيز كل مكون فيها، وقد يستغرق ذلك فترة زمنية طويلة. لذلك يجب أن تبدأ التجارب الأولية بثلاثة تركيزات (منخفض، متوسط، مرتفع) على عناصر البيئة للنبات تحت الاختبار كالآتى:

- السكروز: يحضر عادة بتركيزات ١٪ و ٢٪ و ٤٪.

- العناصر المعدنية: تستخدم بيئة Murashige and Skoog (MS), 1962 كأساس

تحضر منها تركيزات ٢٥٪ و ٥٠٪ و ١٠٠٪ من قوة العناصر المعدنية المذكورة بها.

- الأكسينات مثل: Indole-3-Butyric Acid (IBA) ويحضر بتركيزات ٠,٠١،

٠,٥، و ٥ ملليجرام/ لتر.

- سيتوكاينينات مثل: 6-Benzyl Adenine (BA) وتحضر بتركيزات ٠,٠١، ٠,٥، و

٥ ملليجرام/ لتر.

فإذا كان انطوب إجراء تجارب أولية على ٤ عوامل هي: السكروز والعناصر المعدنية و (IBA) و (BA). ويحضر من كل مركب فى ثلاثة تركيزات. فيكون عدد التراكيب المطلوب تحضيرها هي $4 \times 3 = 12$ تركيبة. لذلك تجرى تجارب زراعة الأنسجة على ١٢ تركيبة غذائية. واختيار أفضلها من حيث تأثيرها على سرعة النمو وجودته. وبهذا يتم الوصول إلى الهدف فى أقصر فترة ممكنة. وقد يستلزم إجراء مزيد من الاختبارات لتحديد التركيز الأمثل من الأكسين أو السيتوكاينين. فإذا ثبت من التجربة الأولى أن أفضل تركيز مثلاً هو ٠,٥ ملليجرام/ لتر. فيفضل إجراء سلسلة اختبارات أخرى تحتوى على تركيزات أقل وأعلى من ٠,٥، مثل ٠,١، ٠,٣، ٠,٥، ٠,٨، ١ ملليجرام/ لتر. وقد يستلزم إجراء سلسلة اختبارات أخرى إذا تغير نوع المحصول.

جدول (١) المكونات الرئيسية للبيئات الغذائية المستخدمة في الزراعة العملية

الماء			
عناصر معدنية		مواد عضوية	
كبرى		صغرى	
N	نيتروجين	Fe	حديد
P	فوسفور	Zn	زنك
K	بوتاسيوم	Mn	منجنيز
Ca	كالمسيوم	Cu	نحاس
Mg	ماغنسيوم	B	بورون
S	كبريت	Co	كوبالت
		Ni	نيكل
		Al	ألومنيوم
		Mo	مولبيدوم
معقدات طبيعية:		مستخلصات نباتية:	
- مستخلص خميرة		Casin hydrolysate كازين	
- لبن جوز الهند		Pepton بيببتون	
		Trypton تريبتون	

أهمية مكونات البيئة الغذائية

١- الماء Water

الماء من أهم المركبات في البيئة الغذائية لأنه الوسط الذى تذوب فيه جميع المكونات، ويستلزم استخدامه فى صورة مقطرة ومعقمة بدرجة عالية. ويفضل استخدام

جهاز من الزجاج البيركس Pyrex لتقطير الماء مرتين. خصوصا لمزارع البروتوبلاست والخلايا الفردية والأنسجة المرستيمية. ويجب تنظيف جهاز التقطير من الداخل بصورة منتظمة للتخلص من الرواسب والشوائب العالقة بالجهاز والمحافظة على جودة الماء المقطر. ويلحق بجهاز التقطير جهاز مزيل للأيونات De-ionizer. ويفضل البعض استخدام أغشية أسموزية لترشيح وتنقية الماء المقطر بهدف مزيد من النقاوة والتعقيم. ويخزن الماء المقطر فى أوانٍ من البولييثين Polythene، حيث يمكن أن تنطلق من جدر الأوانى الزجاجية إلى الماء المقطر آثار من الرصاص والصوديوم والزنك التى يحتويها الزجاج كشوائب. وإذا كان لابد من استخدام الزجاج لتخزين الماء فيجب أن يكون من النوع البيركس.

٢ - السكر Sugar

السكروز من المركبات الهامة جدا الذى يتم تمثيله طبيعيا فى النبات. ولابد من تواجده فى البيئة الغذائية لأهميته كمصدر للطاقة فى تكوين النوات الجديدة. وترجع أهميته إلى عدم كفاءة النباتات المعملية فى بناء السكريات نتيجة ضعف الكلوروفيل وضعف الإضاءة. أو إطالة فترة الظلام التى تتعرض لها النباتات المعملية أحيانا مما يساعد على توقف البناء الضوئى تماما. كما أن تركيز ثانى أكسيد الكربون الناتج عن تنفس النباتات المعملية يكون محدودا وغير كاف لعملية التمثيل الضوئى (George, 1997; Pierik, 1993) ومن الناحية العملية يصعب إمداد البيئة بغاز ثانى أكسيد الكربون، وزيادة تركيزه داخل الأوانى المزروعة يؤدى إلى تسمم النباتات. ويضاف السكروز للبيئة بنسبة ١ - ٥ ٪. وقد يستخدم الجلوكوز والفركتوز والمالتوز والجالاكتوز والسكريات الكحولية مثل الجلسرول والسوربيتول. ويعتمد تركيز السكروز المضاف للبيئة على نوع وعمر النبات النامى. فالأجنة الصغيرة جدا تحتاج إلى نسبة عالية من السكروز. وزيادة تركيز السكروز فى البيئة عن التركيز الأمثل يؤدى إلى تدهور النموات نتيجة تثبيط عملية التمثيل الكربونى وتثبيط تكوين الكلوروفيل والسكروز المتوفر فى السوبر ماركت مناسب لارتفاع نقاوته إذ يحتوى على ٩٩.٩٤ ٪ سكروز

و ٠,٠٢٪ ماء و ٠,٠٤٪ سكريات أخرى مثل الفركتوز والجلوكوز. وتعقيم البيئة بالأوتوكلاف قد يحدث تغييرات للسكريات. كما أن زيادة رقم حموضة البيئة عامل هام في إحداث هذه التغيرات. وتساعد زراعة أجزاء جذرية في البيئة على إحداث تغيير في السكروز نتيجة نشاط إنزيم الإنفرتيز Invertase المفرز من خلايا الجذر. واختلفت آراء الباحثين حول تأثير تعقيم السكر بالأوتوكلاف. ويستخدم السكروز في زراعة البروتوبلاست للمحافظة على الضغط الأسسوزي للبيئة الغذائية وحماية البروتوبلاست من الانفجار. ويضاف السوربيتول Sorbitol أو السكروز بتركيز ٠,٢٣ مولر للمحافظة على البروتوبلاست في البيئة الغذائية. ويعتبر السوربيتول أفضل مصدر للكربوهيدرات في البيئات الخاصة بزراعة أنسجة نباتات العائلة الوردية Rosaceae. ويستخدم السكروز بدلا من السوربيتول مع بعض الأنواع التابعة للعائلة الوردية. ومن ناحية أخرى تنمو أنسجة بعض النباتات مثل الخوخ صنف Reliance في وجود السوربيتول بصورة أفضل بالمقارنة بالسكروز.

٣ - الأملاح المعدنية Mineral salts

تشمل الأملاح المعدنية على العناصر الضرورية الكبرى وهي النيتروجين والفوسفور والبوتاسيوم والكالسيوم والمغنسيوم والكبريت، ونقصها يسبب موت النبات. والعناصر الضرورية الصغرى وهي الحديد والمنجنيز والنحاس والزنك واليورو والموليبدنم والكلور والكوبالت. ويؤثر نقصها على انتظام سير العمليات الحيوية في النبات، ولا تكون سببا مباشرا في موت النبات.

وتعتبر بيئة (MS) Murashige and Skoog (1962) من أكثر البيئات استعمالا في الزراعة العملية. وتستجيب لها معظم النباتات بسهولة. وقد تكون بيئة (MS) غير مناسبة لنمو بعض الثباتات ذات الحساسية الشديدة للتركيزات المرتفعة من العناصر مثل نباتات *Rhododendron*; *Gerbera*; *Kalmia* وبعض النباتات الخشبية، لذلك قد تستخدم تركيزات مخففة من بيئة (MS) أو تستخدم بيئة أخرى منخفضة في العناصر المعدنية مثل بيئة Woody Plant Media (Lloyd and Mc Cown, 1980;

(WPM) Grattapaglia and Machado, 1998). ويفضل تحضير الأملاح باستخدام تركيز الأيونات بالمليمولر. وتتعدد البيئات وتختلف في محتواها من العناصر بما يتناسب مع اختلاف حساسية النباتات تحت التجربة. وتعتبر بيئة (MS) غنية في الأملاح، بينما بيئة Knops فقيرة فيها. ويحتاج النبات ٢-٢٦ ملليمول/ لتر بوتاسيوم، ١-٥ ملليمول/ لتر من كل من الفوسفات (H_2PO_4) والكالسيوم (Ca^{++}) والمغنسيوم (Mg^{++}) والكبريتات (SuO_4). ويعتبر الحديد من العناصر الهامة في البيئة لتأثيره المباشر على نمو وتكشف الأجزاء النباتية المزروعة. ويجب تواجد الحديد والعناصر المعدنية الأخرى في صورة قابلة للامتصاص. مع العلم بأن أملاح الحديد في صورة سترات Citrate وطرطرات Tartrate صعبة الذوبان في الماء وترسب بعد تحضيرها في البيئة الغذائية. بينما تميزت بيئة (MS) بوجود الحديد في صورة مركب Fe-EDTA، وهو من المركبات الخلية المفضلة بالمقارنة بأملاح الحديد الأخرى لأهميته في تنشيط تكوين الأجنة والنمو، ويؤخذ عليه عدم الثبات في البيئة بعد تعقيمها بالأوتوكلاف، حيث يتحد مع مركبات أخرى ويرسب بعد عدة أيام. لذلك يفضل عليه مركب FeNa- EDTA لاحتوائه على الحديد والصوديوم.

ويضاف النيتروجين إلى معظم البيئات في صورة أمونيا (NH_4^+) أو نترات (NO_3). فإذا كانت كمية النيتروجين المطلوب إضافتها للبيئة ١٢-٦٠ ملليمولر فيجب أن يكون تركيز الأمونيا ما بين ٦-٤٠ ملليمولر. وتمتص معظم النباتات النترات بصورة أفضل من الأمونيا، بينما تمتص بعض النباتات الأمونيا بصورة أفضل من النترات. وامتصاص النبات لأيونات الأمونيا يؤدي إلى انخفاض رقم حموضة البيئة وإسالة الآجار ويؤدي بالتالي إلى امتصاص النيتروجين في صورة نيتريت (NO_2). وفي أنواع نباتية عديدة وجد أن للنيتروجين المختزل تأثيره واضحا على نمو الأجزاء النباتية في العمل. وأن أيون الأمونيا (NH_4) في صورة كلوريد أمونيا NH_4Cl أو نترات أمونيا NH_4NO_3 يحقق نموا جيدا لكالس نباتى الكمثرى والتفاح. وإضافة

الأحماض الأمينية وخاصة الأسبرجين Asparagine أو الجلوتامين Glutamine إلى البيئة في وجود الأمونيا لم يُعْطِ أية زيادة ملحوظة في النمو. (Nitsch, et al., 1970) ويدخل النيتروجين في تركيب الأحماض الأمينية والبروتين والكلوروفيل والأحماض النووية (RNA ; DNA). ويدخل النيتروجين في تركيب الإنزيمات التي تعتبر عاملا حيويا هاما تزيد من سرعة التفاعلات الحيوية بالخلية النباتية، ويدخل في كثير من الهرمونات النباتية مثل الأكسينات التي تحتوى على حلقة الإندول مثل (IAA) والسيبتوكاينينات مثل الكاينتين (KIN) والبنزايلى أدينين (BA). ويساعد الأكسين على نمو النباتات وتكوين الجذور وكسر السكون وينشط السيبتوكاينين تكوين الأفرع والتكاثر وزيادة عدد النباتات.

ويدخل الفوسفور في تكوين الفوسفوليبيدات والأحماض النووية ومركبات جلوكوز-١-فوسفات وأدينوزين ثلاثى الفوسفات (ATP) وأدينوزين ثنائى الفوسفات (ADP) وأدينوزين أحادى (AMP) وجميعها مركبات تمد الخلية بالطاقة. بينما يدخل الماغنسيوم فى تركيب الكلوروفيل ويعمل على زيادة اللون الأخضر فى النبات. وغيابه يؤدى إلى اصفرار النباتات ولا تستكمل دورة حياتها. ويؤدى نقص الكالسيوم فى النبات إلى عدم تكوين الصفحة الوسطى Middle lamella أثناء انقسام الخلية واصفرار النبات وإصابة القمة النامية بالقرح Necrosis وظهور ظاهرة التزجج Vertification فى النباتات المعملية. ولا يستطيع النبات استكمال دورة حياته فى غياب عنصر الكالسيوم. والبوتاسيوم من العناصر الضرورية للنبات لأنه يساعد على امتصاص الماء وانتقال السكريات. ولم يعرف حتى الآن المركبات التى يدخل البوتاسيوم فى تركيبها. ويؤدى غياب البوتاسيوم كلية إلى فقد النبات قدرته على تكملة دورة حياته. والكبريت من العناصر الضرورية ويدخل فى تركيب بعض الأحماض الأمينية مثل السيستين والسيستائين والميثيونين وجلوتاثيون. ويساعد الكبريت على إتمام تفاعلات الأكسدة والاختزال ولا يستطيع النبات تكملة دورة حياته فى حالة غيابه كلية.

٤- الآجار Agar

يستخلص الآجار من حشائش البحر Seaweeds فى صورة حبيبات Pellets. ثم ينظف وينقى للتخلص من المواد السامة. ويوضح جدول (٢) محتوى بعض أنواع الآجار من الشوائب العضوية وغير العضوية. ويستخدم الآجار كمادة غرورية فى معظم البيئات الغذائية. والآجار من مشتقات السكريات المتعددة Polysacchrides ذات الوزن الجزيئى الكبير. وله القدرة على ربط جزيئات الماء فيحول البيئة السائلة إلى غرورية. ويخفض ظاهرة التزجج نتيجة انخفاض نسبة الرطوبة الممتصة. ويضاف آجار Difco Bacto Agar إلى البيئة الغذائية بتركيز ٠,٦ ٠,٨ ٪. وللآجار القدرة على الارتباط بجزيئات الماء وادمصاص المركبات الكيميائية بالبيئة. وزيادة تركيز الآجار إلى ١ ٪ فى البيئة يؤدي إلى تصلب البيئة جدا ويصعب ثبات الجزء النباتى عليها نتيجة انخفاض الماء الميسر بالبيئة الغذائية مما يؤخر تكوين الجذور وانخفاض التلامس بين المادة النباتية والبيئة الغذائية مما يؤدي إلى انخفاض قدرتها على امتصاص الماء والعناصر الغذائية. وإذا استخدم الآجار بتركيز أقل من ٠,٤ ٪ تصبح البيئة غير متماسكة Sloppy خصوصا إذا كان رقم الحموضة منخفضا أيضا. بينما إذا استخدم التركيز ٠,٦ ٪ وظلت البيئة غير متماسكة لذلك يجب الرجوع إلى تصحيح حموضة البيئة، لأن رقم الحموضة إذا كان أقل من ٤,٥ - ٤,٨ يؤدي إلى عدم تماسك البيئة. ومضمون ذلك أن نمو المادة النباتية يتأثر بنوع الآجار وتركيزه، لذلك يفضل استخدام آجار نقى وعالى الجودة. ويوضح جدول (٣) محتوى آجار Difco من العناصر. وبالرغم من وجود أنواع أخرى معروفة من الآجار مثل Flow agar; Gibco phytagar إلا إنه يفضل زراعة البروتوبلاست أو الخلايا الفردية فى آجار نقية جدا مثل الأجاروس Agarose. ويمكن استبدال الآجار بمركبات أخرى مثل:

- البولييمرات الصناعية Synthetic polymers مثل البيوجيل Biogel P٢٠٠. وهو عبارة عن حبيبات بولى أكريليميد Polyacrylamide pellets.

– الجينات الصوديوم Sodium alginate ويستخدم فى زراعة البروتوبلاست .
ومواد من السليولوز المتبلور (CCA) Cellulose crystallite aggregate ولها أهمية خاصة فى تكوين جذور القنبيط.

– معقد الجيل رايت Gelrite وهى مادة غروية عالية النقاوة، تتكون من سكريات عديدة مثل الجلوكورونيك Glucuronic والجلوكوز والرامنوز Ramnose وأرثو أسيتيل ميوتيز O-Acetyl moieties. ومعقد Gelrite قادر على تكوين جيل لامع فى وجود ملح المائدة. وتعتمد قوة هذا الجيل على نوع الملح المضاف. فالكاتيونات الثنائية مثل الماغنسيوم (0.1% سلفات ماغنسيوم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) والكالسيوم تعطى جيلا أقوى من الجيل المنضاف إليه أيونات أحادية التكافؤ مثل الصوديوم أو البوتاسيوم. ويحتاج Gelrite إلى حرارة وتوفير كاتيونات ليكون القوام غرويا. ويوصى باستخدام ٠.٢٪ جيل رايت. ويؤخذ عليه أنه يحتوى على آثار من مركبات فينولية قد تسبب سمية للنباتات الناتجة فى العمل.

– مادة نشوية تستخلص من نبات *Nephrolepis exaltata* تستخدم بتركيز ١٢ جرام/ لتر بيئة، وتذوب فى الماء بدون استخدام حرارة.

جدول (٢) محتوى بعض أنواع الآجار من الشوائب العضوية وغير العضوية

المكونات	Bacto agar%	Noble agar%	Purified agar%
Ash	4.5	2.16	1.75
Calcium	0.13	0.23	0.27
Barium	0.01	0.01	0.01
Silica	0.19	0.26	0.09
Chloride	0.43	0.18	0.13
Sulphate	2.54	1.90	1.32
Nitrogen	0.17	0.10	0.14

جدول (٣) محتوى Difco Bacto Agar من العناصر

العناصر	التركيب (جزء في المليون)
Cadmium	0.5 - 0.0
Chromium	0.1 - 0.0
Manganese	0.5 - 0.1
Zinc	10.0 - 0.0
Copper	1.5 - 0.5
Iron	5.0 - 1.5
Lead	0.5 - 0.0
Magnesium	430.0 - 210.0

٥- معقدات طبيعية Natural complex

هى معقدات طبيعية مثل عصائر الطماطم والبرتقال والعنب والأناناس وماء جوز الهند والموز المهروس ومستخلص الخميرة ومستخلص النولت. وتحتوى هذه المعقدات ومستخلصاتها على تركيزات عالية من السكريز وعناصر غذائية ومركبات هامة أخرى يستلزم دراستها لمعرفة مكوناتها وعلاقتها بتنشيط النمو. فقد وجد أن زراعة أنسجة مفصولة من نباتات الموالح على بيئة مضافا إليها ١٠٪ عصير برتقال قد نمت بكفاءة تعادل ستة أضعاف مثيلتها التي لا تحتوى على عصير برتقال، وتعادل مثيلتها التي تحتوى على ١٠٪ سكرورز (Einset, 1978). كذلك ثبت أن ماء جوز الهند يحتوى على مركبات عديدة مثل Myoinositol الذى يدخل فى تركيب البيئات الغذائية كمنشط للنمو، ويدخل أيضا فى بناء الفوسفوليبيدات والمواد البكتينية فى الجهاز الخلوى وفى بناء الغشاء البلازمى. ويضاف Myoinositol إلى بيئة أنواع نباتية

عديد مثل البلارجونيوم *Pelargonium hortorum* بتركيز ٥٠ - ١٠٠ ملليجرام/ لتر، ويعتبر هاما جدا لنمو كالس نبات *Faxonus pennsylvanica* وتكشف كالس نبات *Hawoethia*. ويساعد ماء جوز الهند على نمو وتكشف الأنسجة النباتية المزروعة في المعمل لأنواع نباتية عديدة مثل أجنة نبات الداتورا ونخاع نبات التبغ ومرستيم القصة النامية لنبات *Pharbitic nil*. ويحتوى ماء جوز الهند على مركبات عديدة لها أهميتها في انقسام الخلايا مثل *Diphenylurea* والسيبتوكاينين الطبيعي *Zeatin* ومركب مشابه للكينيتين (KIN) وهو أحد مركبات السيبتوكاينينات. كما يحتوى على العديد من الأحماض الأمينية الحرة مثل فينيل ألانين *Phenyl alanine* الذى له دور فعال في انقسام خلايا نبات فول الصويا. ويضاف ماء جوز الهند للبيئة الغذائية بمعدل ٥٠ - ١٥٠ مليلتر/ لتر (٣ - ١٥٪). وتعتمد الكمية المضافة من ماء جوز الهند على عمر الثمرة حيث يتغير تركيبه بتقدم عمر الثمرة. وإضافة ماء جوز الهند مع الأكسينات للبيئة الغذائية يؤدي إلى انقسام سريع للخلايا. كذلك ثبت أن ماء ثمار جوز الهند الناضجة يحتوى على سيبتوكاينين يسمى *9-β-D-Ribofura-nosylzeatin* ولذلك يستخدم السيبتوكاينين في حالة عدم توفر ماء جوز الهند. كما يحتوى على نيتروجين مختزل له تأثير منشط قوى لنمو الأنسجة النباتية المختلفة. ويستخلص ماء جوز الهند بثقب الثمار بواسطة مثقاب كهربائي. ويجمع الماء من كل ثمرة على حدة فى كأس مستقل. ويختبر السائل للتأكد من صلاحيته. ثم يجمع الماء من الثمار السليمة ويرشح خلال شاشة جبن. ويعقم الراشح بالأوتوكلاف لمدة ١٥ دقيقة عند ١٢١°م ثم يترك ليبرد طول الليل. ثم يرشح فى صباح اليوم التالى، ويحفظ فى وعاء بلاستيك ذات غطاء قلاووظ عند ٢٠°م.

٦ - معقدات طبيعية أخرى

تستخدم بعض المعقدات الطبيعية الأخرى كمصادر للنيتروجين حيث تحتوى على أحماض أمينية وفيتامينات مثل كازين *Casein-hydrolysate* ويضاف بتركيز ١ - ١٠ جرام/ لتر. والبيبتون *Peptone* ويضاف بتركيز ٢٥ - ٣٠ جرام/ لتر. والتربتون *Tryp-*

tone ويضاف بتركيز ٠.٢٥ - ٢ جرام/ لتر. ومستخلص المولت Malt extract ويضاف بتركيز ٠.٥ - ١ جرام/ لتر. ومستخلص الخميرة Ycast extract ، ويضاف بتركيز ٠.٢٥ - ٢ جرام/ لتر. وتستخدم الخميرة لاحتوائها على نسبة مرتفعة من فيتامين B .

٧- معقدات متنوعة Miscellaneous compounds

(أ) أمينات متعددة Polyamincs

تستخدم هذه المركبات لتشجيع خلايا الكالس على تكوين الأجنة. ومن هذه المركبات Putrescine; Spermidine; Spermine. ولوحظ زيادة مركبات Putrescine طبيعيا في أجنة نبات الجزر ونبات *Medicago sativa* أثناء نموها، وإضافة مثبط البولي أمينات Polyamines inhibitor يتوقف تكوين الأجنة، وبإضافة أى مركب من الأمينات المتعددة تستأنف الأجنة نشاطها. ويتواجد مركب Putrescine متزامنا مع بدء تكوين أجنة الجزر. وتساعد الأمينات المتعددة أيضا في تكوين الجذور العرضية. ومضمون ذلك أن الأمينات المتعددة والإنزيمات المرتبطة بنشاطها لها أهمية في انضباط النمو وتطوره، ولها أهمية كبيرة أيضا في حفظ الأنسجة والأصول الوراثية الفادرة لفترات طويلة للاستفادة بها مستقبلا. ويبدو أن مركب Putrescine مشتق من الحمض الأميني L-Arginine. وأن الأمينات المتعددة لها القدرة على منع تحويل الميثيونين Methionine إلى إيثلين Ethylene. والتوازن الداخلي بين الإيثلين والأرجينين والأمينات المتعددة له دور هام في انضباط تكوين الأجنة الجسمية (Rugini and Wang, 1986).

(ب) مركب فينائل يوريا ومشتقاته Phenylurea and its derivatives (DPU)

يعتبر مركب (DPU) مثبطا لإنزيم Cytokinin oxidase المؤكسد للسيتوكاينينات، لذلك يعمل (DPU) على زيادة نشاط السييتوكاينينات (Horgan, 1986). ويعتبر إنزيمي

Thidiazol ureas (Thidiazuron); Pyridyl ureas ومشتقاتهما من أكثر المركبات نشاطا وفعالية، ويعادل نشاطهما ١٠ آلاف مرة قدر نشاط (DPU)، كما أنهما أكثر نشاطا من الزايتين Zcatin (سيتوكاينين طبيعي). وينشط انزيم Thidiazuron نمو الأفرع لنباتات أشجار خشبية عديدة ، ويؤدي تركيز ٠,٠٥ - ٠,١ ميكرومولر من انزيم Thidiazuron إلى زيادة ملحوظة في عدد أفرع نبات *Celtis occidentalis* أكثر بالمقارنة بتركيز ٤ - ١٠ ميكرومولر من مركب (Meyer and (BA) Kernsh, 1986). لذلك يجب أن تنال هذه المركبات اهتمام الباحثين.

(ج) الأدينين Adenine

يضاف الأدينين في صورة سلفات أدينين Adenine sulphate لسهولة ذوبانه في الماء. ويضاف بمعدل ٢ - ١٢٠ ملليجرام/ لتر للبيئة سابقة التجهيز الموجودة في الأسواق (Nitsch, et al., 1967; Skoog and Tsui, 1948). ويشجع الأدينين تكوين الأفرع على أجزاء نباتية متعددة.

٨ - الأكسينات والسيتوكاينينات

تعرف الهرمونات Hormons بأنها مركبات عضوية يتم تمثيلها في النباتات الراقية بصورة طبيعية. وهي مركبات يظهر أثرها المنشط والمنظم في النبات عندما يكون تركيزها منخفضا. وفي الأسواق الآن توجد منظمات نمو صناعية ماثلة للمركبات الطبيعية في تأثيرها الفسيولوجي (Picrik, 1997). ويطلق على المركبات الطبيعية والصناعية اسم منظمات نمو Growth regulators لأهميتها الكبيرة في تنظيم نمو النبات وتطوره وتوزيع المركبات الممثلة في النبات وانقسام الخلايا وزيادة عددها وحجمها. وللأكسينات Auxin والسيتوكاينينات Cytokinin أهمية كبيرة في الزراعة العملية. ومن المستحيل نجاح زراعة الأنسجة في العمل بدون منظمات نمو سواء كانت موجودة طبيعيا في النسيج أم مضافة للبيئة الغذائية. والالتزان بين منظمات النمو المضافة للبيئة ومنظمات النمو الموجودة طبيعيا في الجزء النباتي

له أهمية كبيرة في تنظيم النمو وتكوين الشكل الخارجى للنموات. وعلى ذلك فالأجزاء النباتية التى تحتوى طبيعياً على قدر كاف من الأكسين أو السيتوكاينين لا تحتاج إلى إضافة مثل هذه المركبات إلى البيئة. والأنسجة الحديثة Juvenile لها القدرة على الانقسام وإنتاج نموات جديدة بدون إضافة منظمات نمو للبيئة لاحتوائها طبيعياً على منظمات نمو. بينما تحتاج الأنسجة البالغة Adult إلى إضافة منظمات نمو للبيئة لتنشيط خلاياها على الانقسام. وطبقاً لاحتياج النبات تقسم البينات إلى بيئة يضاف إليها أكسينات فقط وبيئة يضاف إليها سيتوكاينينات فقط وبيئة يضاف إليها (أكسينات + سيتوكاينينات) وبيئة لا تحتاج إلى إضافة منظمات نمو. ويعتبر (Skoog and Miller, 1957) أول من أوضح العلاقة بين تركيز الأوكسينات والسيتوكاينينات وأهمية التوازن بينهما فى البيئة الغذائية وأثر ذلك على طبيعة نمو وتكشف الأنسجة المزروعة. وتختلف النسبة بينهما باختلاف النوع النباتى. ويتم التعرف إلى النسبة المثلى من خلال البحث والتجربة. وتحتاج كثير من الأنسجة النباتية بشكل رئيسى إلى السيتوكاينينات فى حين لا يعتمد البعض الآخر على وجودها. وقد تبين أن احتياج الأنسجة النباتية إلى السيتوكاينينات هى صفة وراثية. ويعتبر المعدل الطبيعى فى جميع البينات الأساسية لمزارع الأنسجة بالنسبة هو ٠,٥ ملليجرام/ لتر سيتوكاينين + ٥ ملليجرام/ لتر IAA فإذا زاد تركيز الأكسين IAA يتكشف الكالس إلى جذور، وإذا انخفض تركيز الأكسين وزاد السيتوكاينين يتكشف الكالس إلى أفرع وأوراق جديدة ونباتات جديدة ذات سوق وأوراق وجذور.

وعند تحضير البيئة تذاب الأكسينات NAA; IBA; IAA فى الماء، وتكون أسهل فى الإذابة إذا كانت فى صورة ملح بوتاسيوم. ويمكن إذابتها أيضاً فى صورتها الحامضية فى ٠,١ مولر هيدروكسيد بوتاسيوم أو هيدروكسيد صوديوم. ويمكن إذابة السيتوكاينينات أيضاً فى ٠,١ مولر هيدروكسيد بوتاسيوم أو هيدروكسيد صوديوم، بينما يذاب الجبرلين فى الماء. وتخزن محاليل IAA والكينيتين فى الظلام لأنها غير ثابتة فى الضوء، بينما IBA; NAA; 2,4-D; BA تكون أكثر ثباتاً فى وجود

الضوء. ويفقد مركب IAA نشاطه في محلوله المائي تدريجيا بإطالة فترة التخزين، كما يفقد نشاطه أيضا بواسطة إنزيمات البيروكسيداز Peroxidase والإندول أسيتيك أسيد أوكسيداز IAA-Oxidase.

٨-١- الأكسينات Auxins

تضاف الأكسينات غالبا للبيئة لتنشيط نمو الكالس وتكوين الجذور العرضية. وتؤدي التركيزات المنخفضة من الأكسينات إلى تكوين الجذور العرضية، بينما التركيزات المرتفعة منها تمنع تكوين الجذور وتؤدي إلى تكوين الكالس. وتثبط نمو السوق العرضية والإبطية لعدم قدرتها على كسر السيادة القمية، كما أنها تثبط تكوين الأجنة في معلق الخلايا. وتعمل الأكسينات على استطالة الخلايا وانتفاخها وانقسامها وانتظام التكوين الظاهري للنموات خصوصا إذا كانت في اتزان مع السيتوكاينين (Pierik, 1997). وتتأثر الأكسينات كثيرا برقم الحموضة وكمية العناصر بالبيئة الغذائية. وتشمل الأكسينات العديد من المركبات أهمها:

3-Indole Acetic Acid (IAA); 3-Indole Butaric Acid (IBA);
2,4,5-Trichlorophenoxy Acetic Acid (2,4,5-T); Naphthalene Acetic Acid (NAA);
2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D); 4,4-Chlorophenoxy Acetic Acid (CPA);
4-Amino- 3,5,6- Trichloropicolinic Acid (Pichloram or TCP)

ويعتبر (IAA) من الأكسينات الضعيفة ويتكون طبيعيا في النبات ويخلق صناعيا. ويضاف إلى البيئة بتركيز ٠,٠١-١٠ ملليجرام/ لتر. وتعتبر الأكسينات الصناعية مثل (IBA ; NAA ; 2,4-D) من الأكسينات القوية وتضاف للبيئة بتركيز ٠,٠٠١-١٠ ملليجرام/ لتر. (Torres, et al., 2001) ويرشح مركب (IAA) قبل إضافته للبيئة الغذائية باستخدام مرشحات بكتيرية لأن تعقيمه بالأوتوكلاف يؤدي إلى تكسيره وتقليل فاعليته. ويحفظ في زجاجات بنية لأنه يفسد بالضوء. كذلك تحفظ البيئة المحتوية على (IAA) في ظلام تام حتى لا تفسد فاعليته. وتعمل الإضاءة على

تكسير هذا الأكسين في البيئة الغذائية بعد ١٤ ساعة من التحضين. كذلك يتأثر (IAA) بالحموضة والأملاح. ويلاحظ أن هذا الأكسين لا يذوب في الماء ويجب إذابته أولاً في كحول إيثانول أو هيدروكسيد البوتاسيوم. ويحضر بإذابة ١٠٠ ملليجرام (IAA) في هيدروكسيد بوتاسيوم تركيز واحد عيارى ثم يكمل إلى ١٠٠ سنتيمتر مكعب بالماء المقطر.

ويستخدم (D-2,4) بتركيز عالٍ كمبيد حشائش وبتركيزات منخفضة في مزارع الأنسجة للمساعدة على تكوين الكالس بالآتزان مع السيتوكينين. ويستخدم (D-2,4) في مزارع الأنسجة في نطاق محدود لأنه يساعد على إحداث الطفرات ويثبط أحياناً عملية التمثيل الضوئي، ولتجنب ذلك يوصى باستخدام مركب TCP بدلاً من D-2,4. بينما لا تسبب (IAA, NAA) هذه الآثار. وتختلف نباتات الفلقة الواحدة عن نباتات الفلقتين في استجابتها لتأثير (D-2,4). ويرجع ذلك إلى قدرة نباتات الفلقة الواحدة على امتصاص (D-2,4) وقدرة هذه المادة على تغيير السلوك الفسيولوجي حيث تمنع تكوين الصفيحة الوسطى Middle lamella وتثبطها أثناء انقسام الخلايا. وثبت أن الأكسين (CPA) هو الأقل تأثيراً بالمقارنة بالأكسينات (D-2,4; T-5, 4, 2). وبمقارنة بالأكسين (IAA) وجد أن (D-2,4) يحفز النمو بمقدار ٨-١٢ مرة، وأن (T-5, 4, 2) يحفز النمو بمقدار ٤ مرات، بينما (CPA) يحفز النمو بمقدار مرتين فقط.

ويستخدم الأكسين (NAA) بكثرة في مزارع الأنسجة النباتية لتكوين الكالس أو تكوين المجموع الجذري في المرحلة النهائية، ويعتبر أقل تأثيراً من IAA من حيث القدرة على إيقاف أو منع تكشف الأجزاء النباتية. والتركيزات المخففة من NAA تؤدي إلى تنشيط تكوين الجذور لبادرات العائلة (*Brme*-Pierik, et al., 1984) (*liaceae*). ويلاحظ أن الاتزان الداخلي للأكسينات والسيتوكينينات هو المحدد في جميع حالات نمو النبات.

ويذوب NAA في الإيثانول وهيدروكسيد البوتاسيوم، ويحضر بإذابة ١٠٠ ملليجرام من الهرمون في هيدروكسيد البوتاسيوم تركيز واحد عيارى، ثم يكمل إلى ١٠٠ سنتيمتر مكعب (في هذه الحالة يكون سنتيمتر واحد مكعب يعادل

واحد ملليجرام). بينما يذاب 2,4-D فى كميات قليلة من هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH). ويخفف المحلول بعد ذلك بإضافة الماء المقطر للوصول إلى الحجم المطلوب. وقد يستخدم مركب Dimethyl sulfoxide لإذابة الهرمونات فيه. وإندول حمض البيوتريك (IBA) من الأوكسينات الهامة المستخدمة على نطاق واسع فى مزارع الأنسجة النباتية بهدف تكوين المجموع الجذرى. وهذا الهرمون ثابت نسبيا بالمقارنة بمركب (IAA)، حيث إنه يتحمل التعقيم ولا يتأثر بالحرارة أو الضوء، ويذوب أيضا فى كحول الإيثانول وهيدروكسيد البوتاسيوم. ويتم تحضيره مثل تحضير مركب IAA.

٨-٢- السيتوكينينات Cytokinins

السيتوكينينات مركبات عضوية مشتقة من الأدينين Adenine (أمينوبورين) Aminopurine. ولها دور هام فى انقسام الخلايا ونمو أنسجة النبات وتؤثر على العديد من العمليات الفسيولوجية مثل تأخير الشيخوخة Senescence للخلايا وتنشيط حركة العناصر المعدنية ونضج الكلوروبلاست وضبط التكوين المورفولوجى للنبات (Torres, et al., 2001). كما أن للسيتوكينين القدرة على تثبيط السيادة القمية وتنشيط نمو الأفرع الجانبية وكسر طور السكون، وتثبط نمو الجذور (George, 1993). ومن أكثر السيتوكينينات استخداما 2iP, BA, KIN (Pierik, 1997). ويذاب الكاينيتين (KIN) فى الماء، ثم يعقم فى أوتوكلاف تحت ضغط بخارى واحد كيلوجرام/سم² لمدة عشرة دقائق. ويذوب الكاينيتين و(BA) فى قليل من حمض الهيدروكلوريك ٠.١ عيارى. وتشمل السيتوكينينات:

6-Benzyl Amino Purine (BAP); 6-Benzyl Adenine (BA); Isopentenyl adenine (IPA); 6-γ-γ-Dimethyl ally Amino Purine (2 ip); 6-Furfuryl- Amino Purine (Kinetin);

5-(4-Hydroxy-3-Methyl- trans-2- Butenylamino) Purine (Zeatin).

أهمية التوازن بين الأكسجين والسيتوكاينينات

الاتزان بين الأكسجين والسيتوكاينين مطلوب غالبا لانتظام تكوين السوق والجذور العرضية. ففي مرحلة الزراعة الثانوية يجب أن يكون مستوى السيتوكاينين أعلى من الأكسجين، بينما ينشط تكوين الجذور إذا كان الأكسجين في مستوى أعلى من السيتوكاينين، وقد يكون وجود السيتوكاينين في البيئة غير ضروري أحيانا (Torres, 2001 et al., (شكل ١).

تركيز السيتوكاينين		تركيز الأكسجين
منخفض +	تكوين الجذور على العقل	+++++++++++ مرتفع
+	تكوين الكالس في نباتات أحادية الفلقات	+++++++++++
++	أول مرحلة في تكوين الأجنة	+++++++++++
++++	تكوين الجذور العرضية من الكالس	+++++++
+++++	تكوين الكالس في نباتات ثنائية الفلقات	+++++
+++++++	تكوين أفرع عرضية	+++
مرتفع ++++++++	نمو أفرع إبطية من ساق نبتة مزروعة	+ منخفض

شكل (١) تأثير توازن الأكسجين: السيتوكاينين على النمو والتكشف

٨-٢- الجبرلين Gibberellins

يؤدى إضافة (الجبرلين + الأكسين) إلى استطالة الخلايا والسلاميات ونمو المستيمات. ويضاف الجبرلين للبيئة لكسر سكون الأجنة والبراعم والبذور والدرنات وغيرها. ويثبط الجبرلين تكوين ونمو الجذور. وتضاف الجبريلينات (GA7 + GA3) لبعض مزارع الأنسجة، و(GA3) هو من أكثر المركبات استعمالاً، والجبريلينات حساسة جداً للحرارة حيث يؤدى تعقيمها بالأوتوكلاف إلى تحطيم ٩٠٪ من نشاطها البيولوجي.

٩- منظّمات نمو أخرى

٩-١- أوليجوسكارين Oligosaccharins

تدخل الأوليجوسكارين في تركيب جدر الخلايا وتنظم سرعة النمو وتكشف الجذور والأزهار ونمو البراعم الخضرية، ولها أهمية في حماية النبات ضد بعض الأمراض وتغييرات الظروف البيئية.

٩-٢- حمض الأبسيسيك (ABA) Absciscic acid

ثبت أن حمض الأبسيسيك له تأثير سلبي على مزارع الأنسجة وعلى نمو الكالس وتكوين الجنين.

٩-٣- الإيثيلين Ethylene

الأجزاء النباتية هي المصدر الرئيسى للإيثيلين المتجمع في أوانى الزراعة، والأوعية البلاستيكية مصدر آخر للإيثيلين. ويزداد تجمعه خلال الأيام الخمسة الأولى من الزراعة ثم ينخفض بعد ذلك. ويؤدى زيادة تجمعه إلى تثبيط نمو وتكوين الأعضاء النباتية. ووضع أنبوبة تحتوى على برمنجانات بوتاسيوم داخل وعاء الزراعة يؤدى إلى التخلص من حوالى ٧٠٪ من الإيثيلين. ولإيثيلين دور هام في تكوين الأبصال (Van Aartrijk, et al. 1986).

٩-٤- فلوروجلوسينول Phloroglucinol

هو مركب فينولي له تأثير مثبط لإنزيم IAA-Oxidase المسئول عن تحلل الأوكسين IAA. لذلك فإن له القدرة على تنشيط النمو وتكوين السوق. ويؤدي إضافة فلوروجلوسينول مع IAA إلى البيئة إلى تنشيط نمو الجذور.

٩-٥- مركبات فينايل يوريا Diphenyl urea compounds

تستخدم هذه المركبات بدلا من السيتوكاينينات بهدف تنشيط النموات الجانبية. حيث تقوم هذه المركبات بوقف نشاط إنزيم Cytokinin oxidase المؤكسد للسيتوكاينين. وبالتالي تحتفظ الخلايا بمستواها الداخلي من السيتوكاينين التي لها أهمية في عمليات التضاعف الكروموسومي.

١٠- فيتامينات Vitamins

معظم النباتات قادرة على تمثيل الفيتامينات إلا إنه لم يدرس الاحتياج الفعلي للأجزاء النباتية من الفيتامينات. ويضاف واحد أو أكثر من الفيتامينات لتحفيز النمو. حيث ثبت أن حامض الفوليك وحامض (PABA) يحفز النمو ولكنهما غير أساسيين في البيئة. وأن الثيامين Thiamine- HCl أساسي لنمو كالس نبات التبغ. وحامض الأسكوربيك لا يحتاجه النبات ولكنه يشجع على النمو فقط في غياب أو انخفاض تركيز الثيامين. ويضاف حمض الأسكوربيك كمركب مضاد للأكسدة وحماية الأجزاء النباتية من الاسوداد (جدول ٤).

جدول (٤) التركيز المناسب من الفيتامينات

التركيز / لتر	الفيتامين
5 - 0.1	Thiamin (Vitamin B1)
10 - 0.1	Riboflavin (Vitamin B2)

تابع جدول (٤)

التركيز/ لتر	الفيتامين
1 - 0.1	Pyridoxin (Vitamin B6)
2.5 - 0.5	Panthothenic acid
0.5 - 0.1	Folic acid
5 - 0.1	Nicotinic acid
1 - 0.5	Para-Aminobenzoic acid (PABA)
200 - 100	Myo-inositol
100 - 1	Ascorbic acid (Vitamin C)
1 - 0.1	Biotin (Vitamin H)
50 - 1	Tocopherol (Vitamin E)

١١- أحماض أمينية Amino acids

الأحماض الأمينية لها أهميتها إذا كان النبات غير قادر على بناء البروتين بالقدر الكافي لاحتياجه. ويضاف الكازين Casein hydrolysis للبيئة كمصدر للأحماض الأمينية بنسبة ٠,٥ - ٠,١ ٪. ويضاف غالبا Tyrosine; Glycine; L-Asparagine L-Glutamine كمصادر إضافية للأمونيا بمعدل ١٠٠ ملليجرام/ لتر. وقد يضاف سلفات الأدينين Adenine sulfate إلى البيئة لتحسين النمو وتكوين الأفرع. ويضاف Biotin; Glycine كمصادر للنيتروجين العضوى.

١٢- الفحم النباتى النشط Activated charcoal

ينتج الفحم النباتى بتفحيم الخشب عند حرارة مرتفعة فى وجود بخار الماء.

ويحتوى الفحم على فراغات بينية دقيقة جداً تجعل مساحة المسطح الفعال به كبيرة وقادرة على ادمصاص جميع المواد السامة والغازات. ويحتوى الفحم النباتى على ٩٥-٩٩٪ فحم نشط، لذلك يفضل الفحم النباتى عن الفحم الحيوانى. ويفضل استخدام الفحم نباتى النوع Merck No. 2186، ويضاف للبيئة بتركيز ٢، ٣-٠٪ (وزن/ حجم) ومن أهم مميزاته: إكساب البيئة لونا غامقا فتصبح مناسبة لنمو الجذور وامتصاص: - الصبغات السامة الملونة الناتجة من المركبات الفينولية مثل الميلانين وغير الملونة الأخرى.

- المواد السامة التى تفرزها الأجزاء النباتية المنفصلة من الموز والأشجار الخشبية.
- المركبات العضوية مثل منظمات النمو والإيثلين والقيتامينات والحديد والزنك وغيرها.

- مركب Hydroxy methyl furfural (HMF) الناتج من انحلال السكرز أثناء التعقيم.

- مركب فينيل حمض الخليك Phenyl acetic acid وحمض البنزويك Benzoic acid التى تنتجها النباتات النامية فى المعمل.

- يساعد على انتظام وثبات رقم حموضة البيئة الغذائية.

ويضاف الفحم النباتى للبيئة كحافز لنمو وتكوين الأعضاء Organogenesis والأجنة Embryogenesis لأنواع عديدة مثل تكوين الأجنة من متوك الأنيمون Anemone والتبغ Nicotiana والقيوناريا Funaria والأوركيدات Orchids وأجنة نخيل البلح والقمم النامية لنبات الزنجبيل Ginger والبصل والجزر البرى، بينما يعتبر مثبطا لنمو فول الصويا وكالس نبات التبغ (Ammirato, 1983).

البيئات الغذائية شائعة الاستعمال

تتكون البيئات أساسا من أملاح العناصر الأساسية الكبرى والصغرى مضافا إليها سكرز كمصدر كربونى ومواد أخرى مثل الفيتامينات والأحماض الأمينية

والأوكسينات والسيتوكاينينات والجبرلين والمركب المخلبي EDTA وبعض المستخلصات الطبيعية مثل ماء جوز الهند وخلاصة الخميرة وعصير الطماطم وغيرها. وقد تكون مكونات البيئة المناسبة لتحقيق جزء نباتي معين ليكون كالس ليست من الضرورة أن تكون مناسبة لتكشف النموات الخضرية والجزرية من هذا الكالس. كما أن مكونات البيئة السائلة المناسبة لنمو جزء نباتي معين لا يعنى أن تكون مناسبة لإحداث نفس الأثر إذا كانت بيئة صلبة. وتستخدم عديد من البيئات في معامل زراعة الأنسجة والخلايا النباتية. وتختلف هذه البيئات في مكوناتها ومن أشهر هذه البيئات:

١- بيئة Murashige and Skoog (MS), 1962

وهي من أشهر البيئات الغذائية، وتستخدم بكثرة في معامل زراعة الأنسجة والخلايا النباتية. وتستخدم لتحقيق الأجزاء النباتية على النمو وتكوين نباتات كاملة لاحتوائها على نسب عالية من النيتروجين والبوتاسيوم. كذلك تستخدم بيئة (MS) لإجراء التجارب عليها عندما يكون الاحتياج الفعلى للنبات غير معروف وأن النبات غير حساس للتركيزات المرتفعة من العناصر. فإذا كان النبات حساساً للأملاح فيستخدم خليط العناصر الغذائية الكبرى والصغرى لبيئة Heller, 1953، وإذا كان النبات حساساً جداً للأملاح فتستخدم بيئة Knop, 1884.

٢- بيئة White (WH), 1963

وتتميز باحتوائها على تركيزات منخفضة جداً من النيتروجين والبوتاسيوم بحيث لا يتناسب مع إحداث نمو جيد للكالس والخلايا النباتية. وعلى الباحث أن يدخل بعض التغييرات المناسبة على تركيز هذين العنصرين بما يناسب نوع النبات تحت التجربة (جدول ٥).

٢ - بيئة (B5), 1976, Gamborg, et al.

استخدمت لأول مرة في زراعة خلايا نبات فول الصويا، وتتميز بارتفاع نسبة النيتروجين والبوتاسيوم. وتستخدم بعد إضافة (2, 4- D) للبيئة بهدف تحفيز الخلايا على الانقسام والتكاثر السريع.

جدول (٥) مكونات بيئة White (WH) من العناصر الصغرى والكبرى

Conc. mg/ l	Micro-elements	Macro-elements	Conc. mg/ l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	KNO_3	80
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	2.5	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	288
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.55	NH_4NO_3	-
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.67	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	19
H_3BO_3	1.5	KH_2PO_4	-
KI	0.75	KCl	70
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.001	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-
Na_2EDTA	-	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	737
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	Na_2SO_4	200
MoO_3	0.0001		
$\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-		

ارشادات عامة عند تحضير البيئة

١- تحضر محاليل مركزة من جميع الأملاح المعدنية والفيتامينات ومنظمات النمو والهرمونات التي تدخل في تركيب البيئة الغذائية (جداول ٦- ١٠). ويفضل ترشيح هذه المحاليل باستخدام ورق ترشيح رقم (٣) قبل حفظها. وتحضر العناصر الكبرى والصغرى كل على حدة بكميات تكفي مستقبلا لعدة تحضيرات من البيئة. وتخزن هذه المحاليل في ظلام في غرفة عادية. ويوجد في الأسواق مخلوط من العناصر الكبرى والصغرى سابقة التجهيز وتسمى تجاريا MS-salts، على أن تتبع الإرشادات المسجلة على العبوة لتجنب بعض المشاكل مثل سرعة الترسيب.

٢- تحفظ المحاليل المركزة بعيدا عن الأتربة ومصادر التلوث عند ٢- ٤°م، مع مراعاة عدم تكوين رواسب أو تغيير لونها. ويجب استخدام هذه المحاليل في فترة لا تزيد عن ٣٠ يوما.

٣- تجزأ محاليل الفيتامينات ومنظمات النمو المركزة في أنابيب اختبار، تحتوى كل أنبوبة على القدر المطلوب إضافته للبيئة عند تحضيرها ثم تخزن الأنابيب عند (٢٠-°م) لحين وقت استعمالها لضمان سلامة محتوى الأنابيب من التلوث. وتحفظ المحاليل المركزة لإندول حمض الخليك (IAA) في مكان مظلم عند ٢- ٤°م.

٤- تضاف خلاصة الخميرة والسكر والإنزيمات إلى البيئة عند تحضيرها. ويضاف ١- ٦٪ آجار عند تحضير البيئة الصلبة، ويفضل أن يكون الآجار على هيئة مسحوق.

٥- يرشح لبن جوز الهند عقب استخراج منه الثمار ثم يعقم بالأوتوكلاف ويحفظ عند (٢٠-°م) لسرعة فساد.

٦- قبل تعقيم المركبات سريعة التلف بالأوتوكلاف يفضل ترشيحها أولا باستخدام ورق ترشيح رقم (٣) ثم تعقم باستخدام مرشحات التعقيم Millipore MF filters

مسامية ($0.22 \mu\text{m}$). وعند ترشيح المحاليل المخففة جدا من منظمات النمو خلال مرشحات التعقيم يفضل التخلص من الكمية الأولى من الراشح لاحتمال إدمصاص جزء من الهرمون على سطح المرشحات مما يسبب انخفاض تركيزه.

٧- تكتب جميع البيانات على الأوانى المحتوية على المحاليل مثل اسم المادة وتركيزها وتاريخ التحضير وأى بيانات تضمن سلامة المحاليل واستخدامها قبل فسادها وفقد جودتها.

٨- إذا كان المطلوب استخدام بيئات صلبة أو سائلة مثل البيئات المستخدمة فى زراعة الأجنة فتوضع أنابيب الاختبار على سطح مائل عقب تعقيمها واستخراجها من الأوتوكلاف عند $45-50^\circ\text{C}$.

٩- يستخدم ماء خالٍ من الأيونات De-ionized water بدلا من استخدام مياه الصنبور لارتفاع محتواه من أيونات الكالسيوم الذى يترسب فى قاع الأوتوكلاف.

١٠- يجب تحديد زمن التعقيم ودرجة الحرارة اللازمة للتعقيم. وقد تستخدم بكتيريا *Bacillus stearothermo- phillis* كدليل بيولوجى للتعرف على سلامة التعقيم حيث تموت بعد $12-15$ دقيقة من التعقيم عند 121°C .

خطوات تحضير البيئة الغذائية

١- تحضر العناصر الكبرى كل بمفرده فى محلول حجمه لتر واحد ويسمى (Stock solution 1).

٢- تحضر العناصر الصغرى كل بمفرده فى محلول حجمه لتر واحد ويسمى (Stock solution 2).

٣- يحضر محلول يحتوى على حديد مخلبى Fe-Chelate بمفرده فى لتر واحد.

٤- يوضع دورق زجاجى يحتوى على 500 مليلتر ماء مقطر على سطح ساخن لتسخين الماء، ثم تضاف إليه الكمية المطلوبة من السكر، ويرفع المحلول مباشرة عن السخان بمجرد وضع السكر.

٥- يضاف إلى محلول السكر الكميات المطلوبة من العناصر الكبرى والعناصر الصغرى والحديد المخلبي مع التقليب الجيد، ثم يوضع بعد ذلك على المسطح الساخن حتى الغليان.

٦- تضاف الأحماض الأمينية المطلوبة بالتركيز المحدد لها. وتختلف نوعها وكميتها باختلاف نوع النبات.

٧- تضاف الفيتامينات للبيئة خصوصا فيتامين (B₁) لأهميته حيث لا يتم تخليقه في النبات، وذلك بالتركيز المحدد للنبات تحت التجربة. وقد لا يستلزم إضافة فيتامينات إذا كانت أجزاء ورقية أو خلايا أو كلوروبلاست لأنها تحتوي على فيتامينات مخلقة ذاتيا.

٨- يضاف أحيانا بعض المعقدات الطبيعية مثل لبن جوز الهند وعصير الطماطم وعصير البرتقال ومستخلص الخفيرة ومستخلص الفشا والكازين لقدرتها العالية على تنشيط النمو.

٩- تضاف منظمات النمو (الأكسينات والسيتوكاينينات) عادة بتركيزات منخفضة جدا مع مراعاة الاتزان بينهما ونسبة الإضافة حسب الهدف من الزراعة. وقد يضاف الجبرلين لبعض البيئات إذا كان له أهمية.

١٠- تضبط حموضة البيئة عند ٥.٧ - ٥.٨ باستخدام جهاز pH-meter ويستخدم في ذلك محاليل مخففة من هيدروكسيد صوديوم وحامض هيدروكلوريك. ثم يضاف الآجار عند تحضير البيئة الصلبة فقط. ويخلط الآجار مع ماء بارد مع التقليب الجيد ثم يضاف إلى البيئة. ويجب عدم إضافة الآجار أثناء غليان الماء حتى لا يحدث طبع زائد له ويسبب تأثيرات ضارة. ويفضل إضافة الآجار باستخدام قمع مع الحرص بعدم تكوين تكتلات في المحلول أو حدوث فوران أو رغاوى. ثم يستكمل الحجم إلى واحد لتر بالماء المقطر.

١١- توزع البيئة المحضرة على أواني الزراعة (أنابيب، دوارق مخروطية، برطمانات). ويراعى انتظام توزيع البيئة الغذائية ومنع التصاقها بالجدار الداخلى أو الخارجى.



جدول (٦) محتوى بعض البيئات الغذائية الهامة من الأيونات

Medium Component	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	6 mM	7 mM
N-Total	10.942	16.036	7.058	27.385	76.756	27.336	60.017
NH_4^+	-	7.567	-	8.994	2.028	2.608	20.612
NO_3^-	10.942	8.469	7.058	18.391	24.728	24.728	39.405
H_2PO_4^-	1.837	1.837	0.906	0.500	1.087	2.608	1.249
K^+	4.310	1.837	10.060	9.897	25.815	24.728	20.042
Ca^{2+}	4.234	4.234	0.510	1.496	1.163	1.360	2.993
Mg^{2+}	1.014	1.014	1.014	0.751	1.014	1.623	1.501
SO_4^{2-}	1.014	4.789	1.014	0.751	2.028	1.623	1.501
Na^+	-	-	7.964	-	-	-	-
Cl^-	-	-	11.080	2.991	2.325	2.721	5.986

1. Knop, 1884. 2. Knudson, 1946. 3. Helder, 1953. 4. Nitsch, 1972.
 5. Gamborg, et al, B5, 1976. 6. Schenk & Hildebrandt, SH, 1972.
 7. Murashige & Skoog, MS, (1962)

جدول (٧) محتوى بعض البيئات الغذائية الهامة من العناصر الكبرى
 (ملليجرام/لتر)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
KNO_3	250	-	-	950	2500	2500	1900
NaNO_3	-	-	600	-	-	-	-

تابع جدول (٧)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1000	1000	-	-	-	-	-
NH_4NO_3	-	-	-	720	-	-	1650
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	-	500	-	-	134	-	-
$\text{H}_2\text{PO}_4 \text{NH}_4$	-	-	-	-	-	300	-
$\text{H}_2\text{O NaH}_2\text{PO}_4$	-	-	125	-	150	-	-
KH_2PO_4	250	250	-	68	-	-	170
KCl	-	-	750	-	-	-	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	-	75	220	150	200	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	250	250	185	250	400	370

جدول (٨) محتوى بعض البيئات الغذائية الهامة من العناصر الصغرى
(ملليجرام/ لتر)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	1.0	-	-	-	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	27.8	27.8	15.0	27.8
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	25.0	0.1	13.2	13.2	13.2	22.3

تابع جدول (أ)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	7.5	1.0	2.0	2.0	1.0	8.6
H_3BO_3	-	-	1.0	3.0	3.0	5.0	6.2
KI	-	-	0.01	0.75	0.75	1.0	0.83
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-	-	0.03	0.025	0.025	0.2	0.025
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	0.25	0.25	0.1	0.25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	0.025	0.025	0.1	0.025
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	0.03	-	-	-	-
AlCl_3	-	-	0.03	-	-	-	-
Na_2EDTA	-	-	-	37.3	37.3	20.0	37.3

1. Knop, 1884. 2. Knudson, 1946. 3. Héller, 1953. 4. Nitsch, 1972.
 5. Gamborg, et al. (B5), 1976. 6. Schenk and Hildebrandt (SH), 1972.
 7. Murashige and Skoog, (MS), 1962

جدول (٩) محتوى بعض البيئات الغذائية من العناصر الكبرى

Medium Component	MS mM	MS mg/l	MS mg/l	B5 mg/l	WH mM	WH mg/l
KNO_3	18.8	1900.0	25.0	2500.0	0.8	80.0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	1.2	288.0

Medium Component	MS mM	MS mg/l	B5 mM	B5 mg/l	WH mM	WH mg/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100.0	27.8	100.0	27.8	-	-
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$	0.1	-	-	-	6.3	2.5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	60.0	10.0	-	-
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100.0	22.3	-	-	29.8	6.55

جدول (١٠) محتوى بعض النباتات النبتاتية من العناصر الصغرى

Medium Component	MS mM	MS mg/l	B5 mM	B5 mg/l	WH mM	WH mg/l
H^+NO_3	20.0	1650.0	-	-	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	1.0	134.0	-	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	1.1	150.0	0.12	19.0
KH_2PO_4	1.25	170.0	-	-	-	-
Cl	-	-	-	-	0.9	65.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.0	440.0	1.0	150.0	-	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5	370.0	1.0	250.0	3.0	737.0
K_2SO_4	-	-	-	-	1.4	200.0

تابع جدول (٩)

تابع جدول (١٠)

Medium Component	MS mM	MS mM	B5 mM	B5 mg/l	WH mM	WH mg/l
MnSO ₄ · H ₂ O	-	-	60.0	10.0	-	-
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	30.0	8.6	7.0	2.0	9.3	2.67
H ₃ BO ₃	100.0	6.3	50.0	3.0	25.0	1.5
KI	5.0	0.83	4.5	0.75	4.5	0.75
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.1	0.025	0.1	0.025	0.004	0.001
Na ₂ EDTA	100.0	37.3	100.0	37.3	-	-
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1.0	0.25	1.0	0.25	-	-
MoO ₃	-	-	-	-	0.007	0.0001

الاحتياجات الواجبة عند تحضير البيئة

١- يجب أن تكون جميع المواد الداخلة فى تركيب البيئة الغذائية نقية، وتستخدم ملعقة نظيفة معقمة لكل مادة. ثم تعاد عبوات المركبات الكيميائية إلى أماكن حفظها بعد غلقها جيداً.

٢- توجد فى الأسواق بيئات غذائية جاهزة التحضير تحتوى على العناصر الكبرى والصغرى وحديد مخلىبى. ويفضل استخدامها لأسباب اقتصادية وتوفيراً للوقت والمجهود.

٣- تحضر البيئة باستخدام المحاليل المركزة للعناصر الكبرى والعناصر الصغرى التى سبق تحضيرها. ويوزن الآجار والسكر عند الحاجة إليهما. وتحضر محاليل منظمات النمو والفيتامينات قبل الاستخدام مباشرة.

٤- قد تتكون رواسب بمحالييل العناصر الكبرى والصغرى أثناء التخزين حتى ولو كان التخزين بارداً. وتسبب الرواسب مشاكل كثيرة. ومحاولة إعادة إذابتها بالحرارة أو الغليان قد يؤدي إلى تغيير تركيزها في المحلول نتيجة فقد الماء بالبخار، وفي هذه الحالة يفضل التخلص منها وإعادة تحضيرها.

٥- يفضل معاملة البيئة الغذائية بالبخار بدلاً من الغليان لإذابة الآجار، حيث إن المعاملة بالبخار تكون أكثر أماناً وتقلل من حدوث تحلل كيميائي غير مرغوب فيه.

٦- المواد التي تتأثر بالحرارة مثل الفيتامينات ومنظمات النمو تضاف بعد تعقيم البيئة بالأوتوكلاف وتبريدها لدرجة حرارة ٤٥ - ٥٠ م°، وتستخدم المرشحات المعقمة Filter-sterilization لتعقيمها.

٧- قد يضاف للبيئة الغذائية فحم نباتي نشط للاستفادة من قدرته على امتصاص الغازات السامة التي تتجمع حول جذور النباتات، على أن يضاف للبيئة قبل التسخين أو بعد التسخين مع التقليب الجيد حتى يتجانس تماماً مع البيئة الغذائية. ثم تعقم البيئة في الأوتوكلاف عند ١٢١ م° و ١,٥ ضغط جوى ولمدة ١٥-٢٠ دقيقة.

٨- في حالة الضرورة تخزين البيئة الغذائية بعد تحضيرها، مع مراعاة تجنب تخزينها لمدة طويلة للمحافظة على ثبات المركبات الكيميائية الداخلة في تكوينها ومنع التبخير الشديد للماء منها.

٩- توزع البيئة في الأواني وهي دافئة ثم تترك للتجمد، مع مراعاة وضع أنابيب الاختبار في وضع مائل حتى تتجمد البيئة. وتحفظ الأواني المحتوية على بيئة غذائية عند ٥ م° لحين زراعتها.

١٠- تغطي الأنابيب والدوارق بورق ألومنيوم بعد صب البيئة الغذائية فيها.

خلق الأواني بعد زراعتها

تغلق الأوعية بعد زراعتها لمنع تلوثها وجفافها، مع المحافظة على سهولة تبادل الغازات داخل الوعاء مع الجو الخارجي، وتجنب نقص الأكسجين ومنع تراكم

غازات ثاني أكسيد الكربون والإيثيلين داخلها. ويجب أن تتوفر هذه المواصفات في جميع أغشية الأنابيب والدوائر. ويستخدم في غلق أواني الزراعة المعملية ما يلي:

- ١- سدادات قطن صوفى Cotton wool وهي تستخدم بكثرة ويتم تشكيلها يدوياً، ولها أهميتها في المعامل التجارية. وتوجد ماكينات لتشكيل هذه السدادات بالحجم والمواصفات المطلوبة. ويجب ألا تتعرض هذه السدادات إلى اللهب بعد الحقن لأن الصوف الزجاجي الصناعي يعطى عند حرقه مواد ضارة وخطيرة.

- ٢- سدادات Steristop مسامية يمكن دفعها داخل الأنبوبة.
- ٣- غطاء ألومنيوم Aluminum cap يثبت على فوهة الإناء بكليبس.
- ٤- ورق الألومنيوم Aluminum foil يستخدم خاصة للدوائر المخروطية الكبيرة.
- ٥- غطاء من الزجاج الشفاف Transparent glass تمتاز بإعادة تعقيمها.
- ٦- غطاء حلزوني Screw cap يستخدم لتغطية الأنابيب والدوائر ذات الفوهة الحلزونية. وعند استخدامها يجب ألا تكون محكمة الغلق حتى لا تمنع تبادل الغازات بين داخل الأنبوبة وخارجها.
- ٧- سدادات فوم Foam plugs.
- ٨- شرائح فيتا فيلم Vita film رقيقة وأنواع أخرى مثل Para film; Polypro- pylene film; PVC plastic film، ويجب أن تسمح هذه المواد بتبادل الغازات ولا تسمح بخروج بخار الماء.

احتياطات غلق الأواني بعد زراعتها

- ١- يؤدي الغلق المحكم إلى تجمع ثاني أكسيد الكربون والإيثيلين داخل أواني الزراعة ويمنع تبادل هذه الغازات بالهواء الجوى. وزيادة تركيز هذه الغازات داخل الأواني له تأثير سام على النموات بداخلها. والأغشية المصنوعة من ورق (الألومنيوم+البولي بروبيلين Polypropylene) لها مضارها حيث إنها غير منفذة للغازات، بينما الأغشية المصنوعة من البولي بروبيلين نفاذة للغازات ولا تنفذ بخار الماء.

٢- تعتبر الأنابيب والصناديق والأغطية البلاستيكية مصدرا لغاز الإيثيلين خصوصا إذا كانت محكمة الغلق.

٣- تؤدي زيادة الرطوبة داخل الأواني المزروعة إلى ظهور ظاهرة التزجج .
Verification.

٤- الأغطية الزجاجية وغيرها من الأغطية الصناعية الشفافة تسمح بنفاذ الضوء من أعلى، بينما الأغطية القطنية وأوراق الألومنيوم غير منفذة للضوء.

تقدير تركيز مكونات البيئة الغذائية

يقدر تركيز المواد الداخلة في مكونات البيئة الغذائية بطرق عديدة منها:

١- النسبة بالحجم Volume percentage وتستخدم عادة عند استخدام محاليل طبيعية مثل ماء جوز الهند وعصير الطماطم، ويحضر ماء جوز الهند بمعدل ٥٠ مليلتر + ٩٥٠ مليلتر ماء مقطر.

٢- النسبة بالوزن Weight percentage وتستخدم عادة عند تحضير الآجار والسكريات والأملاح المعدنية. ويتم تحضيرها بإذابة الوزن المطلوب بالجرام من المادة في حجم معلوم من البيئة الغذائية.

٣- المولر Molar ويستخدم التركيز بالمولر عادة عند تحضير منظمات النمو. والمول الواحد يساوي الوزن الجزيئي للمركب مقدرًا بالجرام. والمولر يساوي واحد مول من المادة مذابة في لتر. فمثلا:

(أ) طريقة حساب المولر للأكسين IAA.

واحد مولر لمركب IAA = الوزن الجزيئي بالجرام / لتر = ١٧٥,١٨ جرام / لتر.

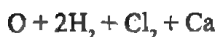
واحد ملليمولر IAA (mM) = ٠,١٧٥١٨ جرام / لتر.

واحد ميكرومولر IAA (μM) = ٠,٠٠٠١٧٥١٨ جرام / لتر = ٠,١٧٥١٨

ملليجرام / لتر.

(ب) طريقة حساب المولر لمركب كلوريد الكالسيوم $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

يحسب الوزن الجزيئي لمركب $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، وذلك بجمع الأوزان الذرية للعناصر الداخلة في المركب:



الوزن الجزيئي = $40.08 + 2 \times 35.453 + 2 \times 1.008 + 2 \times 16.00 = 147.018$
 واحد مولر $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = الوزن الجزيئي بالجرام / لتر = 147.018 جرام / لتر.
 واحد ملليمولر $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mM) = 0.147018 جرام / لتر.
 واحد ميكرومولر IAA (μM) = 0.000147018 جرام / لتر = 0.147018 ملليجرام / لتر.

٤- ملليجرام / لتر (mg l⁻¹) Milligram/ L ويستخدم هذا المعيار عند تحضير منظمات النمو فمثلا:

١٠^{-٦} = واحد ملليجرام / لتر و $10^{-٦} = 0.1$ ملليجرام / لتر.

٥- ميكروجرام / لتر (1 $\mu\text{g l}^{-1}$) microgram/ L

واحد ميكروجرام / لتر يساوي 0.001 ملليجرام / لتر.

٦- جزء في المليون (PPM) Part per million.

جزء واحد في المليون يساوي واحد ملليجرام / لتر.

١٠^{-٦} = ملليجرام / لتر (mg l⁻¹) و $10^{-٦} = 0.1$ جرام / لتر (g l⁻¹)

ويفضل استخدام المولر في مجال فسيولوجيا النبات، فمثلا يصعب مقارنة النشاط الفسيولوجي لتركيز واحد ملليجرام IAA / لتر مع ملليجرام واحد IBA / لتر لاختلافهما في عدد الجزيئات في اللتر. بينما مقارنة ميكرومولر واحد IAA مع ميكرومولر واحد IBA يكون مقبولا لاحتواء المحلولين على نفس العدد من جزيئات المادتين. ومسجل في الجداول التالية الوزن الذري للعناصر الداخلة في البيئة (جدول ١١)، والأوزان الجزيئية لمركبات العناصر الكبرى والصغرى (جدول ١٢) والسكريات والفيتامينات ومركبات أخرى (جدول ١٣) والأكسيدات والسييتوكينينات والجبرلين (جدول ١٤).

جدول (١١) الأوزان الذرية للعناصر الداخلة في البيئات الغذائية

Element	Atomic Weight	Element	Atomic Weight
Aluminium (Al)	26.98	Manganese Mn	54.94
Boron (B)	10.82	Molybdenum (Mo)	95.95
Calcium (Ca)	40.08	Nickel (Ni)	58.71
Carbon (C)	12.011	Nitrogen (N)	14.008
Chloride (Cl)	35.457	Oxygen (O)	16.00
Cobalt (Co)	58.94	Phosphorus (P)	30.975
Copper (Cu)	63.54	Potassium (K)	39.10
Hydrogen (H)	1.008	Sodium (Na)	22.991
Iodine (I)	126.91	Sulphur (S)	32.066
Iron (Fe)	55.85	Zinc (Zn)	65.38
Magnesium (Mg)	24.32	-	-

جدول (١٢) الأوزان الجزيئية لمركبات العناصر الكبرى والصغرى للبيئة الغذائية

Compound		Atomic Weight
1- Macro-elements		
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	80.04
Ammonium sulphate	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	132.15

تابع جدول (۱۲)

Compound		Atomic Weight
Calcium chloride	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147.02
Calcium nitrate	$\text{Ca}(\text{NH}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236.1
Magnesium sulphate	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.47
Potassium chloride	KCL	74.55
Potassium nitrate	KNO_3	101.11
Potassium dihydrogen Orthophosphate	KH_2PO_4	136.09
Sodium dihydrogen Orthophosphate	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	156.01
2- Microelements		
Boric acid	H_3BO_3	61.83
Cobalt chloride	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	237.93
Cupric sulphate	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249.68
Manganous sulphate	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	223.01
Potassium iodide	KI	166.01
Sodium molybdate	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241.95
Zinc sulphate	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287.54

تابع جدول (١٢)

Compound		Atomic Weight
Sodium EDTA	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	372.25
Ferrous sulphate	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278.03
Ferric-sodium EDTA	FeNaEDTA	367.07

جدول (١٣) الأوزان الجزيئية للسكريات والفيتامينات ومركبات أخرى

Compound	Molecular Weight
1 - Sugers and Alcoholic sugars	
Fructose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	180.15
Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	180.15
Manitol ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$)	182.17
Sorbitol ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$)	182.17
Sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	342.31
2- Vitamins	
Ascorbic acid (Vit. C)	176.12
Biotin (Vit. H)	244.31
Calcium pantothenate (Ca salt of Vit. B1)	476.63
Cyanocobalamine (Vit. B1)	1357.64

تابع جدول (١٣)

Compound	Molecular Weight
L-Cystein HCL	157,63
Folic acid	441,40
Inositol	180,16
Nicotinic acid Or Niacin (Vit.B3)	123,11
Pyridoxine HCL (Vit. B4)	205,64
Thiamine HCL (Vit. B1)	337,29
Glycine	75,07
L - Glutamine	146,15
3- Other compounds	
Abscissic acid	264,31
Colchicine	399,43
Phloroglucinol	126,11

جدول (١٤) الوزن الجزيئي للأكسينات والسيتوكاينينات والجبرلين

Phloroglucinol Compound	Molecular weight
I- Auxins	
p-Chlorophenoxy Acetic Acid (p-CAA)	186.59

تابع جدول (۱۴)

Phloroglucinol Compound	Molecular weight
2,4-Dichloro Acetic Acid (2,4-D)	221.04
Indole 3-Acetic Acid (IAA)	175.18
3-Indole Butyric Acid (IBA)	203.23
-Naphthalene Acetic Acid (NAA)	186.20
β -Naphoxy Acetic Acid (NOA)	202.20
2- Cytokinins / Purins	
Adenine (AD)	189.13
Adenine sulphate (ADSO4)	404.37
G-Bezyl Adenine (BA) or 6- Benzyl Amino Purin (BAP)	225.20
N-Isopentenyl Amino Purine (2-ip)	203.3
6- Furfurylamine purine (Kinetin)	215.21
6-Benzylamino -9-Tetra- hydropyranyl-H-purine	309.40
6-(4 Hydroxy-3-Methylbut- 2-enylamino) purine	219.20
3- Gibberellin	
Gibberellic Acid (GA3)	346.37

الباب الخامس

إنتاج الكالس Callus induction

يؤدى إحداث جرح فى أى عضو نباتى إلى تنشيط الخلايا عند السطح المجروح والخلايا المجاورة لها وتنقسم وتكون كتلة خلوية تسمى بالكالس تعمل على التئام الجرح. ويعتبر الكالس بأنه كتلة من خلايا غير محددة أو مميزة المعالم له القدرة على الانقسام السريع. وينتج الكالس بسهولة فى المعمل من أى نسيج نباتى يزرع على بيئة مناسبة. ويمكن اكثاره بتجزئته وزراعة الأجزاء على بيئة مناسبة تحتوى على أملاح معدنية وفيتامينات ومنظمات نمو ومصدر كربونى (سكر). (سكر).

سرعة نمو الكالس فى البيئة السائلة

بعد زراعة خلايا الكالس فى بيئة سائلة تبدأ مرحلة يتوقف فيها النمو لفترة محدودة. بعدها تبدأ الخلايا فى الانقسام السريع، ويزداد عددها وحجمها حتى تصل إلى مرحلة الثبات العددي، وهى مرحلة تصل فيها كثافة الخلايا حدها الأقصى ثم تنخفض سرعة الانقسام حتى تتوقف تماما نتيجة زيادة عدد الخلايا واستنزاف واحد أو أكثر من العناصر المكونة لمعلق الخلايا. وفى هذه المرحلة تكون الخلايا سابحة فى البيئة مفردة أو متجمعة أو خليط منهما. فمثلا كالس نبات *Anthurium andreanum* ينمو فى صورة خلايا متكتلة Clumps. بينما كالس الجزر يتفكك بسهولة إلى خلايا فردية أو متجمعة. فإذا كان النمو الناتج ضعيفا فقد يكون سببه ضعف الجزء النباتى، لذلك يفضل زراعة جزء نباتى آخر تحت نفس ظروف التحضين مع تخفيض تركيز منظمات النمو فى البيئة. فإذا كان نمو الكالس مازال

ضعيفا، فهذا دليل على أن البيئة المستخدمة غير مناسبة، لذلك يفضل إضافة بعض المعقدات الأخرى للبيئة مثل لبن جوز الهند وكازين ومستخلص الشعير النابت ومستخلص الخميرة وغيرها. ويختلف لون وتركيب وطريقة نمو الكالس باختلاف الأنواع النباتية. فقد يكون لونه أبيض أو ملونا، وقد يكون هشاً أو متماسكاً، وقد يكون طريا (مائيا) أو صلباً، وقد يكون سهل أو صعب التفكك إلى خلايا. وقد تحدث طفرات في الخلايا الداخلية للكالس. وقد يفقد الكالس احتياجه من الأكسجين و/ أو السيتوكاينين بعد تكرار الزراعة العملية ويكون قادرا على الاكتفاء الذاتي بما يحتويه من منظمات النمو.

إنتاج كالس نبات التبغ Tobacco

١- إنتاج كالس من ساق التبغ

١- تفصل قطع بطول ٣ سم تقريبا من ساق حديثة لنبات جيد النمو خالي من الآفات. وتغمس نهايات القطع في شمع بارافين سائل لتغطيتها وحمايتها أثناء عمليات التعقيم المتتالية.

٢- ينظف السطح الخارجى للقطع الساقية ويزال شمع البارافين من عليها مع الاحتفاظ بوجوده على الأسطح المجروحة فقط. ثم تعقم بغمسها في ٧٠٪ كحول إيثانول لمدة ٢٠ - ٣٠ ثانية، يتبعه تعقيما كاملا في محلول هيبوكلوريت الصوديوم (تركيز الكلور ٢٪ تقريبا). ويمكن استخدام بعض المعقدات الأخرى مثل Calcium hypochlorite; Mercuric chloride; Bromine water. ويوصى بإضافة ١ - ٢ نقطة من أحد مركبات التخلص من التوتر السطحي مثل Tween- 80 إلى محلول التعقيم لتحسين انتشاره.

٣- تشطف القطع الساقية ٥ - ٦ مرات في ماء مقطر معقم، ثم تقطع إلى أقراص بسمك ٣ - ٢ ملليمتر، مع استبعاد النهايات المجروحة المغطاة بالبارافين. ويوضع كل قرص أفقيا على بيئة (MS) صلبة تحتوى على ٣٠ جرام سكروز/ لتر + ٢.٤ ملليجرام واحد

D/ لتر + ٠,٢ ملليجرام/ لتر كاينيتين. ثم تحضن عند ٢٤-٢٨ م° وضوء فلوروسنت. وبعد ١-٣ أسابيع يبدأ تكوين الكالس بصورته البلورية. وبعد ٤-٨ أسابيع يصبح حجم الكالس صالحا للتجزئة وإعادة زراعته فى بيئة مماثلة ولكنها طازجة لإكثاره.

٢- إنتاج كالس من ورق التبغ

تفصل ورقة حديثة العمر من نبات التبغ، ثم تعقم سطحيا وتقطع إلى أجزاء ويزرع كل جزء فى بيئة صلبة فى أنبوبة اختبار. فيتكون كالس فى مواقع الجروح على الأجزاء الورقية. وتجرى الزراعة الثانوية Sub-culturing إذا كانت هناك حاجة لزيادة كمية الكالس. فيجزل الكالس بعد وصوله للحجم المناسب، ثم تزرع الأجزاء فى بيئة طازجة صلبة أو سائلة لتشجيعه على النمو. وتكرر هذه الخطوة عدة مرات باستخدام بيئة طازجة. وبالفحص الميكروسكوبى يمكن ملاحظ وجود تجمعات خلوية أكبر حجما عن باقى خلايا الكالس. وظهور هذه التجمعات الخلوية بعد فترة قصيرة من زراعة الكالس يعنى ميله لتكوين أجنة ونموات جديدة مبكرا وهى ظاهرة غير مرغوبة لأنها تؤثر فى كمية الكالس الناتج. ويجب التخلص من هذه التجمعات الخلوية حتى يعود الكالس لنشاطه فى النمو والانقسام مع توفير البيئة الغذائية ومنظمات النمو المناسبة. وتظهر التجمعات الخلوية كبيرة الحجم إذا احتوى الجزء النباتى على خلايا برانشيمية، وتختفى إذا احتوى على خلايا مرستيمية.

العوامل المؤثرة فى تكوين الكالس

١- عمر الجزء النباتى

ينتج الكالس من زراعة أى جزء نباتى فى بيئة غذائية مناسبة. وتعتبر الخلايا أو الأنسجة المفصولة من نباتات حديثة العمر Juvenile أو من نباتات عشبية هى الأفضل فى إنتاج ونمو الكالس بالمقارنة بالأنسجة البالغة Adult. وأن الأجزاء الطرفية تحتوى على مستوى هرمونى أعلى من الأجزاء القاعدية والبالغة.

٢- نوع النبات

يمكن إنتاج الكالس بزراعة أى جزء نباتى مفصول من نباتات ذات فلقين أو فلق واحدة فى بيئة مناسبة. ويختلف الكالس فى تكوين نباتات باختلاف النوع النباتى ومحتوى البيئة الغذائية والبيئة المحيطة. فمثلا الأجزاء النباتية المفصلة من النوع *Anthurium andraeanum* لها القدرة على تكوين كالس وإنتاج نموات جديدة، بينما قدرة النوع *Anthurium scherzerianum* منخفضة (٧٥٪)، وهما نوعان يتبعان للجنس أنثوريوم *Anthurium*. كذلك يتكون الكالس من متوك الجارونيا *Geranium* بنسبة ٦٢-١٠٪. وتعتبر النباتات أحادية الفلقات *Monocotyledons* أقل إنتاجا للكالس بالمقارنة بالنباتات ثنائية الفلقات *Dicotyledons*. وفى حالة صعوبة إنتاج الكالس من نباتات أحادية الفلقات يفضل زراعة أجنة أو أوراق حديثة العمر أو بادرات أو أزهار حديثة جدا مع إضافة الأكسين للبيئة كمنشط لتكوين الكالس. وإنتاج الأجنة من الكالس قد يكون صعبا أو مستحيلا لبعض الأنواع النباتية، وقد تتكون على الكالس أجنة عرضية تدخل فى سكون عميق يصعب انكساره. وتوجد ظواهر كثيرة يصعب تحليلها مثل انخفاض أو فقد كامل لقدرة خلايا الكالس على النمو والتكاثر بعد عدة مرات من الزراعة الثانوية، أو تكوين نباتات مباشرة بدون تكوين أجنة عرضية. وقد يكون لمنظمات النمو دور رئيسى فى نمو وتكاثر بعض الأنواع النباتية بينما البعض الآخر قد يبدأ فى التكاثر الخضرى تلقائيا فى غياب منظمات النمو.

٣ - صورة البيئة الغذائية

تنجح زراعة الكالس فى بيئة صلبة أو سائلة، إلا إن نموه أسرع فى البيئة السائلة لوجود تلامس مباشر بين الخلايا والبيئة مما يزيد استفادة الخلايا من مكونات البيئة. وهز الدوايق المحتوية على بيئة سائلة باستخدام جهاز رج يساعد على سرعة نمو الكالس وتفكك خلاياه وزيادة مساحة الأسطح الملامسة للبيئة وإمداد الكالس بالأكسجين. وتساعد البيئة الصلبة على إنتاج نموات من الكالس مبكرا قبل

اكتمال نموه. ويفضل رج البيئة على هزاز دوار Rotary shaker بسرعة ٨٠ - ١٠٠ دورة/ الدقيقة ، وقد تخفض سرعته أحيانا إلى ٤٠ دورة/ الدقيقة وقد تزداد إلى ١٢٠ دورة/ الدقيقة. ويجب أن تحتوى الدوارق المخروطية ٢٠ - ٣٠٪ من سعتها. ويفضل تخفيض كمية البيئة الغذائية فيها إذا كانت كمية الخلايا أو التجمعات الخلوية المزروعة فيها قليلة.

٤ - البيئة الغذائية والبيئة المحيطة

تستخدم بيئة (MS) قبل أو بعد تطويرها لإنتاج الكالس على أن تحتوى على سكروز أو جلوكوز بنسبة ٢ - ٤٪ وقد يضاف إلى البيئة الكازين Casein hydrolysate ومستخلص الشعير النابت Malt extract والخميرة وماء جوز الهند. وتختلف الأكسينات والسيبتوكاينينات المضافة للبيئة من حيث نوعها وتركيزها والنسبة بينهما باختلاف نوع النبات والنمط الوراثى ومحتوى الجزء النباتى من الهرمونات. ونسبة الأكسين و/ أو السيبتوكاينين لها أهمية فى إنتاج الكالس. فقد تحتاج بعض النباتات إلى أكسين فقط مثل النباتات أحادية الفلقة وقد تحتاج البعض الآخر إلى سيبتوكاينين فقط، وقد يستلزم وجود الأكسين + السيبتوكاينين (Steward, et al., 1964).

ويستلزم لتكوين كالس بعض الأنواع النباتية توفير الضوء أو الظلام بما يتناسب ونوع النبات على أن تحضن عند ٢٢ - ٢٨°م.

٥ - الزراعة الثانوية

الكالس هو عبارة عن نسيج سريع النمو. وقد يفقد الكالس قدرته الذاتية على الانقسام والنمو أثناء الزراعة الثانوية إذا اتجه إلى تكوين نباتات أو أجنة. ويجب ألا يضعف الكالس أو يفقد كفاءته فى التكاثر بتكرار الزراعة الثانوية لذلك تزال النموات الخضرية التى تتكون عليه مبكرا قبل أن يصل إلى الحجم المناسب للزراعة الثانوية.

٦ - ظهور طفرات وتغييرات وراثية ذاتيا

تتميز خلايا الكالس بسرعة انقسامها وسرعة تأثرها للتغييرات التي تحدث في مكونات البيئة الغذائية والظروف البيئية المحيطة. وينتج عن ذلك عدم انتظام انقسام خلايا الكالس وحدوث اضطرابات في توزيع الكروموسومات والجينات أثناء انقسام الخلايا. ويؤثر ذلك بوضوح على شكل ولون الكالس وتكوين الأجنة منه. لذلك تستبعد خلايا الكالس التي حدثت بها تغييرات وراثية شاذة. وقد يهتم بها مستحدثو الطفرات. وجدول (١) يبين بعض التغييرات في عدد الكروموسومات بخلايا كالس نباتات الذرة الأحادية Haploid النامية في بيئة مضافا إليها أكسين وسيتوكاينين (Kochhar, et al., 1971).

جدول (١) تباين عدد الكروموسومات في كالس ونباتات الذرة *

Ploidy level	Callus		Plants*	
	No. of cells	%	No. of cells	%
Hypohaploid (> 10)	34.0	7.9	25.0	3.9
Haploid (= 10)	383.0	89.7	564.0	87.4
Hypodiploid (> 20)	2.0	0.2	10.0	1.6
Diploid (= 20)	8.0	1.9	46.0	7.1
Total	427.0	99.7	645.0	100.0

* عدد النباتات المختبرة ٣٥ نبات

ظاهرة التزجج Verification

هي ظاهرة فسيولوجية تصيب الكالس حيث يتحول مظهره إلى ما يشبه الزجاج. ويطلق على هذه الظاهرة أسماء عدة مثل Glassiness; Glauciness; Translucency;

Waterlogging; Hyperhydration Hyperhydric transformation. ويحدث التزجج أضرارا كثيرة للكالس مثل عدم استكمال نموه وميله إلى تكوين نباتات مبكرة عليها جذور. وقد تحقق ذلك في كالس أنواع وأصناف عديدة تابعة للأجناس *Prunus Malus* والقرنفل والخرشوف. ومن العوامل المساعدة على ظهور التزجج ارتفاع نسبة الرطوبة في البيئة الغذائية مثل البيئة السائلة. وزيادة نسبة الرطوبة الذاتية في خلايا الجزء النباتي مثل تلك المفصلة من نباتات غضة حديثة العمر. واستخدام بيئات غنية في الأملاح المعدنية مثل بيئة (MS). وانخفاض أو عدم وجود الآجار. وبعض أنواع الآجار قد تكون سببا في ظهور التزجج. وانخفاض الضوء، وارتفاع الحرارة، والتعقيم الشديد. ويمكن منع أو تقليل التزجج باستبدال بيئة (MS) الغنية بالأملاح ببيئة Lepoivre عند زراعة أجزاء مفصلة من نباتات *Prunus Malus*; أو تستخدم بيئات ثنائية المظهر (2-Phase media) أو تحسين تبادل الغازات في الأوعية المنزوعة.

تكشف الأجنة الجسمية من الكالس

تنتج الأجنة الجسمية بزراعة خلايا أو أجزاء نباتية زراعة معملية ويطلق على هذه الأجنة بأنها أجنة خضرية أو عرضية أو لا جنسية. بينما الأجنة الجنسية هي أجنة ناتجة من التلقيح والإخصاب وتفصل من البذور. وعلى ذلك فإن النباتات الناتجة من أجنة جسمية نوع من أنواع التكاثر الخضري وهي امتداد لصفات نبات الأم. وعند الكشف تتحول بعض خلايا الكالس إلى أجنة جسمية Somatic embryogenesis ممثلة بسيتوبلازم كثيف. ثم تتحول إلى براعم جسمية تحتوى خلاياها على فجوات عصيرية صغيرة الحجم. وتنمو البراعم لتكون نباتات. وينشأ الجنين الجسمي من خلية فردية، ثم تنقسم هذه الخلية وتكون ما يشبه الجنين الأولي Pro-embryo-like في صورة عقدة Nodular أو نسيج متكتل يشبه البرعم Bud-like. وقد ينشأ الجنين الجسمي من خلايا داخلية في كتلة خلايا الكالس Endogenously أو من خلايا سطحية Exogenously وتسمى أجنة عرضية. وتتكشف الأجنة بإحدى الطريقتين (Ammirato, 1983):

١- تكشف مباشر Direct differentiation

يتكون الجنين فى هذه الحالة من خلية أو عدة خلايا من الجزء النباتى مباشرة بدون الدخول فى مرحلة تكوين الكالس. وتسمى الخلايا التى ينشأ منها الجنين باسم Pro-embryonic determined cells (PEDCs). وفصل جزء من هذا الجنين وزراعته يؤدى إلى تحديث كامل له. ومن أمثلة ذلك زراعة أجزاء مفصولة من نسيج النيوسيلة Nucellus tissue الموجود فى بعض أنواع الموالح والمانجو التى تتميز بظاهرة تعدد الأجنة Polyembryony وخلايا الإبيدريم Epidermal cells للمسوية الجنينية لنباتات الجزر البرى و*Ranunculus sceleratus* و*Linum usitatissimum* و*Brassica napus*.

٢- تكشف غير مباشر Indirect differentiation

يعنى ذلك إنتاج الأجنة من الكالس. وفى هذه الحالة ينزع الجزء النباتى فى بيئة سائلة لتكوين معلق خلايا. وتلقى هذه الطريقة اهتماما كبيرا فى المجال التجارى لكثرة عدد الأجنة الجسمية الناتجة. ويزرع أعداد كبيرة من الخلايا الجسمية فى أحجام صغيرة من البيئة السائلة. ويمكن إنتاج حوالى ١٠٠٠ أجنة جسمية من كل جرام واحد من النسيج. ويستلزم التخلص من الخلايا والأجنة المتكشفة مبكرا بهدف تشجيع الكالس على الاستمرار فى النمو والانقسام لإكثار كميته. وقد أمكن بهذه الطريقة إنتاج أجنة جسمية من نسيج اللحاء الثانوى Secondary phloem للجزر وأجزاء مفصولة من ورقة نبات البن العربى *Coffea arabica* والبييتونيا *Petunia hyb-rida* والأسبرجس *Asparagus officinalis*.

البيئة الغذائية المناسبة لإنتاج أجنة جسمية

١- من الواضح الآن أن الكالس قادر على تكوين أجنة جسمية تتكشف إلى سوق وجذور عرضية. ويرتبط تطور الجنين الجسمى بوجود الأكسين والسيتوكينين

فى البيئة الغذائية ، حيث تتكون نموات خضرية من نسيج الكالس إذا توفر تركيز منخفض من الأكسين وتركيز مرتفع من السيتوكاينين. ويعتبر مركب (BA) هو أكثر السيتوكاينينات المنشطة لتكوين أفرع عرضية. كذلك التركيز المرتفع من العناصر الغذائية فى البيئة يساعد على إنتاج أفرع عرضية. وقد تتكون الجذور العرضية فى بعض الحالات عند قاعدة الأفرع العرضية. وتتكون منشآت الجذور Root primor-dial عادة فى بيئة تحتوى على تركيز مرتفع نسبيا من الأكسين وتركيز منخفض من السيتوكاينين. بينما تحتاج لنموها إلى تركيز أكثر ارتفاعا من الأكسين. وقد تنمو الجذور والسوق من الكالس فى وقت واحد دون الارتباط ببعضهما.

٢- إمداد البيئة الغذائية بالأكسين له أهمية لمعظم النباتات للبدء فى تكوين الأجنة. وغالبا التركيز المرتفع من الأكسين يكون مطلوبا لتكوين الأجنة ، والتركيز المنخفض من الأكسين لازما لتنشيط نمو الأجنة بعد تكوينها، وغياب الأكسين يؤدى إلى إنضاج مبكر للجنين. وقد لا يستلزم إضافة الأكسين إلى بيئة بعض الأنواع النباتية. وللأكسين 2,4-D أهمية كبيرة فى تكوين أجنة النباتات العشبية مثل النجيليات. بينما ليس للسيتوكاينينات دور هام فى هذا الشأن. ويمنع الجبريلين والإيثلين تكوين الأجنة.

٣- يساعد ارتفاع تركيز الأمونيوم على نمو السوق والجذور، وإمداد البيئة الغذائية بالنيتروجين المختزل فى صورة أيونات أمونيوم له أهمية للزراعات العملية. فالنيتروجين المختزل (مثل أملاح الأمونيا) أو لبن جوز الهند أو الكازين Casein hydrolysate أو الأحماض الأمينية مثل L- Alanine و L- Glutamine قد يكون لها أهمية فى تنشيط وتكوين الأجنة. وأوضح Pierik and Steegmans, 1976 أن تخفيض تركيز الأمونيوم فى حالة نبات *Anthurium andraeanum* ينشط تكوين الأفرع العرضية على نسيج الكالس.

٤- البوتاسيوم ينشط تكوين الأجنة، والتركيز المرتفع من الكالسيوم يثبط تكوين الأجنة.

٥- ينشط الضوء عموما تكوين الأجنة، بالرغم من أنه يمكن تكوين الأجنة لبعض الأنواع النباتية فى ظروف شدة ضوء منخفضة أو فى ظلام. والحرارة المرتفعة عادة

مرغوبة لتكوين الأجنة. وتحتاج زراعة المتوك لبعض النباتات إلى صدمة باردة Cold shock لتنشيط تكوين الأجنة ونموها.

٦- التركيز الأمثل للسكر هو ٢-٣٪ تقريبا.

٧- حمض الأبسيسيك Absciscic acid يتكون طبيعيا في النبات وله تأثير مثبط للنمو، إلا إن له بعض التأثيرات الواضحة على نمو الأجنة في المزارع المعلقة. فمثلا بعد زراعة الخلايا في بيئة سائلة لوحظ وجود اختلافات في نمو وتطور التجمعات الخلوية الناتجة ما بين تجمعات صغيرة وكبيرة من الخلايا المرستيمية وخلايا مهياة لتكوين أجنة مبكرة بجانب خلايا عادية. ويعنى ذلك عدم تجانس الخلايا في معلق الخلايا. وإضافة حمض الأبسيسك كان له تأثير واضح على خفض هذه الاختلافات في نمو الخلايا وجعل الأجنة تتطور طبيعيا.



الباب السادس

إنتاج نباتات خالية من الأمراض

أ- إنتاج نباتات خالية من الفيروسات

تسبب الفيروسات أمراضا كثيرة مثل موزايك البطاطس Potato mosaic وتورد القعة في الموز Banana-Bunchy Top Virus وموزايك قصب السكر Sugar can mosaic وقوباء الموالح Citrus psorosis والتدهور السريع في الموالح Citrus tristeza وموزايك التبغ Tobacco mosaic. وتسبب الأمراض الفيروسية خسائر فادحة في النباتات، فمثلا تسبب فيروسات (V. Y) مرض التفاف الأوراق في البطاطس وفقد ٣٠٪ تقريبا من المحصول العالمي من الدرنات، وانتقالها من جيل إلى جيل يؤدي إلى تدهور خطير في محصول الدرنات يصل إلى ٥٠-٨٠٪. لذلك أصبح من أهداف الزراعة المعملية الحصول على نباتات خالية من الفيروسات. واهتمت دول كثيرة بإنتاج بطاطس خالية من الأمراض الفيروسية باستخدام زراعة الأنسجة. وواكب ذلك ارتفاع متوسط المحصول من ١١ طنا إلى ٢٠ طنا بالمكثف في الفترة ١٩٧٠-١٩٨٨. وتبنت دول كثيرة تطبيق زراعة الأنسجة مثل الدنمارك (١٩٨٥) والسويد (١٩٨٥) والمكسيك (١٩٨٧) وكوبا (١٩٩٢). ويوجد الآن على الأقل ١٣٦ صنفا تجاريا من البطاطس خالية من الإصابة الفيروسية، بالإضافة إلى أصول مرجعية خالية من الأمراض لبعض المحاصيل الحقلية والبستانية، كذلك تم تحديث أصناف قديمة من البطاطس وغيرها من المحاصيل التي تتميز بارتفاع المحصول والتكيف في النضج. واصطلاح «خالي من الفيروس» Virus free هو اصطلاح غير دقيق لعدم وجود نباتات خالية من جميع الفيروسات. ولكن توجد نباتات خالية من بعض الفيروسات دون غيرها. وسوف يستخدم الاصطلاح «Virus free» في هذا العرض للتعبير عن نباتات خالية من فيروسات معروفة ومحددة بواسطة الأجهزة العلمية.

طريقة دخول الفيروس في النبات

تدخل الفيروسات النبات من خلال الجروح. وتساعد الأدوات الزراعية والحشرات والقوارض والنييماتودا على انتشار الإصابة. ويخترق الفيروس أنسجة النبات ببطء حتى يصل إلى نسيج اللحاء الحامل للمواد الغذائية الممتلئة وينتقل الفيروس إلى أجزاء النبات المختلفة بسرعة انسياب تيار المواد الغذائية الحاملة له وفي الاتجاه الذي تنجذب إليه. فيتحرك معها إلى الجذر لأنه منطقة جذب قوية في مرحلة البادرة. ثم ينتشر من الجذر إلى أعلى الأوراق الحديثة الملتفة التي تعتبر منطقة جذب أخرى حتى يكتمل تمددها وتصبح قادرة على بناء وتصدير المواد الممتلئة بدلا من جذبها. ويتقدم عمر النبات تنجذب المواد الممتلئة حاملة الفيروسات إلى مناطق التخزين مثل الدرنات والأبصال والثمار وغيرها، حيث تعتبر مناطق جذب أخرى (Sharabash, 1981 a,b; 1980; 1977). وثبت أن تواجد الفيروسات يكون ضعيفا أو منعدما في الطرف المرستيمي للقمم النامية. لذلك فإن دراسة حركة الفيروسات وسرعة انتشارها وأماكن تركيزها وعلاقة ذلك بنوع النبات ومراحل نموه لها أهمية عند اختيار حجم المرستيم المناسب للزراعة. ويختلف انتشار الفيروسات في النباتات كالآتي:

- فيروسات تتحرك في الخلايا الحية فقط.
- فيروسات تنتشر في اللحاء فقط مثل فيروس تجعد الأوراق والتفاف الأوراق في البطاطس.
- فيروسات تنتشر في الخلايا البرانشيمية فقط مثل فيروس موزايك الخيار وفيروس تبرقش البطاطس. بالرغم أن سرعة تحرك الفيروسات منخضة في الخلايا البرانشيمية.
- فيروسات تنتشر في الخلايا البرانشيمية واللحاء على السواء مثل فيروس موزايك التبغ.
- فيروسات تنتشر بصورة غير منتظمة في أعضاء النبات المختلفة مثل فيروس تبرقش التبغ (TMV) Mosaic Virus Tobacco.

- فيروسات تنتشر فى مساحات من ورقة النبات يفصلها مساحات بينية خالية من الفيروس مثل موزايك نباتات البييتونيا والكرنب والتبغ.

أعراض الإصابة الفيروسية

لا تدل أعراض الأمراض الفيروسية غالبا على الفيروس المسبب لها، فقد تتشابه وتتداخل بعض الفيروسات فى مظهر الإصابة. فمثلا تشترك فيروسات A, S, Y, X فى إظهار أعراض تبرقش أوراق البطاطس. وقد تظهر أعراض الإصابة الفيروسية على الأوراق على هيئة بقع صفراء أو خضراء باهتة متبادلة مع مناطق خضراء داكنة (موزايك) كما فى البطاطس والفاصوليا والفلفل والقمح والقمب، أو فى صورة خطوط باهتة اللون Streak على أوراق القصب، أو اصفرار كما فى أوراق الخوخ. وقد تظهر الأعراض فى صورة التفاف أو تجعد الأوراق كما فى البطاطس والطماطم، أو تقزم للسوق كما فى القمح والشعير، أو تقرحات على السوق كما فى قوباء الموالح. وقد تظهر الأعراض على الأزهار مثل تدهور Breaking out أزهار التيولب وندوة البراعم Bud blight فى فول الصويا. وقد تظهر على الثمار على هيئة تبرقش كما فى موزايك الخيار.

الاحتياطات اللازمة لإنتاج نباتات خالية من الفيروس

الأدوات المستخدمة فى التكاثر الخضرى هى المصدر الرئيسى للغالبية العظمى لعدوى وانتشار الفيروسات بين النباتات. ولوحظ أن ٨٠ نوعا من حوالى ٦٠٠ نوع من الفيروسات كانت البذور أحد مصادر العدوى. لذلك يستلزم قبل الدخول فى برنامج إنتاج نباتات خالية من الفيروسات أن يتوفر الآتى:

١- تكون نباتات الأم خالية من الإصابة الفيروسية، ويفضل تنميتها فى صوبة نظيفة خالية من الفيروسات ومحمية من مسببات الإصابة بالفيروسات مثل الحشرات الماصة والقوارض والنيماطودا.

٢- المحافظة على سلامة العينات النباتية والأدوات المستخدمة في فصلها من نبات الأم والأدوات والأواني المستخدمة في الزراعة فهي جميعها مصدر لإعادة التلوث بالفيروس.

٣- الارتفاع بمستوى النظافة الشخصية للعاملين ونظافة ملابسهم وأحذيتهم.

٤- تكون جميع مراحل الزراعة العملية تحت ظروف معقمة.

٥- المحافظة على النباتات الجديدة الناتجة في المعمل ومنع إصابتها. وقد يستلزم إبقاء النباتات الخالية من الفيروسات نائمة في المعمل تحت ظروف بيئية نظيفة مع متابعتها وفحصها والكشف عليها للتأكد من سلامتها.

أهمية المرستيم في إنتاج نباتات خالية من الفيروس

المرستيمات التي تفصل من براعم طرفية أو قاعدية على فرع رئيسي أو جانبي جميعها مناسبة للزراعة العملية. وتختلف نسبة النجاح باختلاف موقع البرعم وعمر الساق الحامل للبرعم إن كان حديثاً أو معمرًا. واستخدم المرستيم بنجاح في إنتاج نباتات خالية من الفيروسات من الداليا Dahlias والبطاطس وعديد من الأنواع النباتية مثل Carrots, Potatoes Raspberry, Cherry, Grapes, Tobacco, Trifolium, Lolium, Forsythia. ومن الواضح أن المرستيم أهميته في إنتاج نباتات خالية من الفيروس لكثير من الأنواع النباتية، ولم يكن له نفس الأهمية في أنواع نباتية أخرى بسبب سهولة انتشار الفيروس في جميع أنسجتها.

أسباب خلو المرستيم من الفيروسات

- يتكون المرستيم من خلايا نشطة وسريعة الانقسام. وهذه الخلايا لا تحتوى على مواد غذائية بالقدر المناسب لنشاط وانقسام الفيروس. وقد يكون ذلك سببا في عدم وجود الفيروس في النسيج المرستيمي. بينما الخلايا الواقعة أسفل المنطقة المرستيمية تكون بطيئة الانقسام قادرة على الزيادة في الحجم والامتلاء بالمواد الغذائية. وعلى ذلك فإن الفيروس يزداد نشاطه ويتكاثر بسهولة في الخلايا أسفل المنطقة المرستيمية.

– يساعد عدم اكتمال نمو اللحاء والخشب في المرستيم على إعاقة انتقال الفيروس إليه (White, 1934a).

– غياب البلازموديمات Plasmodesmata بين خلايا المرستيم ، وهى أوعية تربط بين الخلايا غير المرستيمية. وقد يكون ذلك سببا فى غياب الفيروسات من المرستيم.

– قد يكون ارتفاع تركيز منظمات النمو فى الخلايا المرستيمية سببا فى تثبيط نشاط الفيروس وإعاقة حركته وقدرته على النفاذ. وقد يكون عدم توفر الإنزيمات فى الخلايا المرستيمية سببا فى وقف نشاط وتكاثر الفيروس.

– احتمال وجود مثبطات نمو طبيعية فى الخلايا المرستيمية تكون سببا فى انخفاض تركيز الفيروس. وقد يكون ذلك سببا لخلو البذور من الفيروسات.

وبالرغم من هذه الآراء فإنها غير كافية لتعليل خلو مرستيمات بعض الأنواع النباتية دون غيرها من الفيروسات ووجود فيروسات فى بذور بعض الأنواع النباتية.

المعاملات المساعدة للتخلص من الفيروس

(أ) المعاملة الحرارية

هى وسيلة فعالة فى تثبيط نشاط العديد من الفيروسات المتماثلة فى الحجم Iso-metric viruses والمايكوبلازما ويجب اختيار درجة الحرارة المناسبة والمدة اللازمة لتثبيط حيوية الفيروس دون أن تؤثر على حيوية النبات.

١- معاملة المرستيم بالحرارة

تطبق هذه المعاملة إذا كانت نباتات الأم مصابة بأكثر من فيروس. وفى هذه الحالة يفضل المرستيم ثم يحضن بعد زراعته مباشرة فى العمل عند ٣٥-٣٨°م لمدة ٥- ١٠ أسابيع. وتساعد هذه الطريقة بنجاح على التخلص أو خفض كثافة الفيروس فى البطاطس والكريزانثم والقرنفل والفراولة.

٢- معاملة النباتات بالحرارة

نظرا لصعوبة الحصول على المرستيم أحيانا. لذلك تطبق المعاملة الحرارية على النباتات المعملية لهذه النباتات. وتعتبر البراعم الإبطية أكثر الأجزاء استجابة للمعاملة الحرارية. وقد ثبت نجاح المعاملة الحرارية للنباتات المعملية عند ٣٠-٣٨°م للتخلص من الفيروسات والميكوبلازما التي تصيب بعض أشجار الفاكهة وبعض المحاصيل مثل قصب السكر والكاسافا (Morel, 1964). وبالمعاملة الحرارية أمكن التخلص من فيروس تبرقش الخيار Cucumber mosaic virus من الأفرع النامية بالمعمل كذلك أمكن التخلص من فيروسات البطاطس بتخزين الدرنات عند ٣٧-٣٨°م لمدة شهر قبل فصل المرستيم منها لزراعتها في المعمل (Morel, 1964).

(ب) المعاملة بالمواد الكيميائية

انتشار الكائنات الدقيقة مثل الفيروسات والميكوبلازما والبكتيريا والفطر داخل أو بين الخلايا يحول دون وصول المبيدات إليها والتخلص منها. وقد تضاف مركبات مثل Vidarabine; Virazole (Ribavirine) إلى البيئة الغذائية للمساعدة على تثبيط نمو هذه الكائنات الممرضة، ويؤخذ عليها ارتفاع ثمنها. وإضافة مركب Virazole (Ribavirine) لبيئة نباتات الليلي Lily والتفاح يؤدي إلى إنتاج نباتات خالية من الفيروسات. ويثبط مركب Vidarabine عملية التمثيل الضوئي Antimetabolites في النبات. كما أن إضافة المضادات الحيوية والمبيدات البكتيرية مثل: Rifampicin, Penicilin- G, Oxytetracycline, Tetracycline, Streptomycin, Achromycin, Chloromycine, 8- Hydroxy quinoline, Gentamycin. للبيئة غير مرغوب فيه لعدم تأثيرها على الفيروسات، وأن لها تأثيرا مبطئا فقط على البكتيريا والفطريات العالقة على الأسطح الخارجية للجزء النباتي، وليس لها تأثير على الإصابة المنتشرة داخل الخلايا أو بينها. وإضافة المبيدات البكتيرية إلى المزارع المعملية بالتركيز

المناسب لقتل البكتريا قد يكون له تأثير سام للنباتات النامية، خصوصا المركبات التي لها تأثير ضار على الريبوسومات أو تكوين مركبات سامة ناتجة من تفاعلها مع مكونات البيئة الغذائية. ويؤدي التركيز العالي من المضادات الحيوية إلى تثبيط النمو واستحداث سلالات ميكروبية مقاومة لها.

طرق إنتاج نباتات خالية من الفيروس

ينتج الآن على الأقل ٦٥ نوعا نباتيا خاليا من الفيروس بزراعة القمم المرستيمية، بجانب كثير من الأصول المرجعية (نباتات أم) كمصدر خالٍ من الأمراض لكثير من المحاصيل الحقلية والبستانية. ويمكن اتباع إحدى الطرق الآتية لإنتاج نباتات خالية من الفيروس:

- ١- زراعة مرستيم Meristem culture مفصول من عقل طرفية لنبات الأم.
- ٢- زراعة مرستيم مفصول من نبتة معملية.
- ٣- زراعة كالس أو بروتوبلاست.
- ٤- تطعيم المرستيم على أصول جذرية Rootstocks خالية من الفيروس.

١- زراعة مرستيم طرفي من نبات الأم

تفصل عقل طرفية من نباتات الأم. ثم تنظف جيدا بالماء ثم تشطف بالماء المقطر المعقم. مع الحرص على تغلغل الماء بين الأوراق. ثم تزال جميع الأوراق من العقل الطرفية بقدر الإمكان. ثم تغمس لمدة قصيرة في كحول ٧٠٪ للتخلص من الهواء المتبقى بين قواعد الأوراق والأجزاء الأخرى.

تعقم العقل الطرفية سطحيا بغمسها في محلول ١,٥٪ هيبوكلوريت صوديوم مضافا إليه ٠,٠٥٪ مادة ناشرة مثل Tween-20 أو Teepol أو Trigelol ثم تشطف جيدا في ماء مقطر معقم. ثم يزال ما تبقى من أوراق صغيرة حول القمة المرستيمية للعقل الطرفية، ويتم ذلك تحت ميكروسكوب ضوئي. (X 40-20)

تعقم العقل الطرفية مرة ثانية في محلول مخفف من هيبوكلوريت صوديوم، ثم تشطف في ماء مقطر معقم. ويفضل الشطف في كحول ٧٠٪ ولا يفضل الشطف بالماء، لأن وجود قطرات ماء لاصقة قد تسبب بعض المشاكل أثناء فصل النسيج المرستيمي تحت الميكروسكوب.

تعاد العقل الطرفية مرة ثانية وتثبت تحت الميكروسكوب لإزالة الوريقات المتبقية حول المرستيم واحدة بعد الأخرى. ويستخدم سلاح شفرة حاد ومعقم. ويكرر التعقيم أثناء هذه الخطوة. وتتم تلك الخطوة والخطوات التالية داخل كابينة معقمة.

يفصل الطرف المرستيمي من القمة النامية بسلاح شفرة معقم عندما تصبح خالية من الأوراق إلا من ١ - ٢ من منشئات الأوراق المحيطة بها. ويستخدم ميكروسكوب ومصدر ضوئي (فلوروسنت) أثناء فصل المرستيم. ويكون شكل القمة المرستيمية على هيئة مكعب تقريبا، وقد يصل قطره ٠,٢ ملليمتر وطوله ٠,٣ - ٠,٥ ملليمتر تقريبا. ثم يزرع المرستيم بعد فصله مباشرة في بيئة غذائية حتى لا يتعرض للجفاف.

ولتقييم كفاءة تعقيم الأجزاء النباتية، يضاف للبيئة ٢ - ٣٪ تريبتون أو بيبتون، ثم تزرع فيها أجزاء نباتية معقمة بعد شقها طوليا بحيث يكون السطح المجروح ملاصقا للبيئة. فإذا ظهر بعد أيام قليلة من التحضين نموات لكائنات دقيقة في البيئة الغذائية يدل ذلك على رداءة التعقيم. ونتائج هذه الطريقة غير مشجعة عادة حيث لا توجد بيئة غذائية محددة يمكن استخدامها كدليل جيد لكل أنواع البكتيريا التي تنمو داخل الأنسجة.

عوامل انجاح المرستيم في الزراعة العملية

يجب أن يكون محاطا بواحدة أو اثنتين من الوريقات الأولية (منشئات الأوراق) للمحافظة على رطوبته وحيويته. مع العلم بأن زيادة حجم المرستيم

وزيادة عدد الوريقات حوله يقلل كثيرا من فرصة الحصول على نباتات خالية من الفيروس.

٢- تعتمد نسبة نجاح النباتات الخالية من الفيروس على الموسم الزراعى، حيث وجد أن تكوين الجذور على النموات الناتجة من المرستيم المنزوع معمليا كان أفضل إذا فصل فى الربيع. وكان ذلك مؤكدا بالنسبة للبطاطس والقرنفل.

البيئة المناسبة لزراعة المرستيم

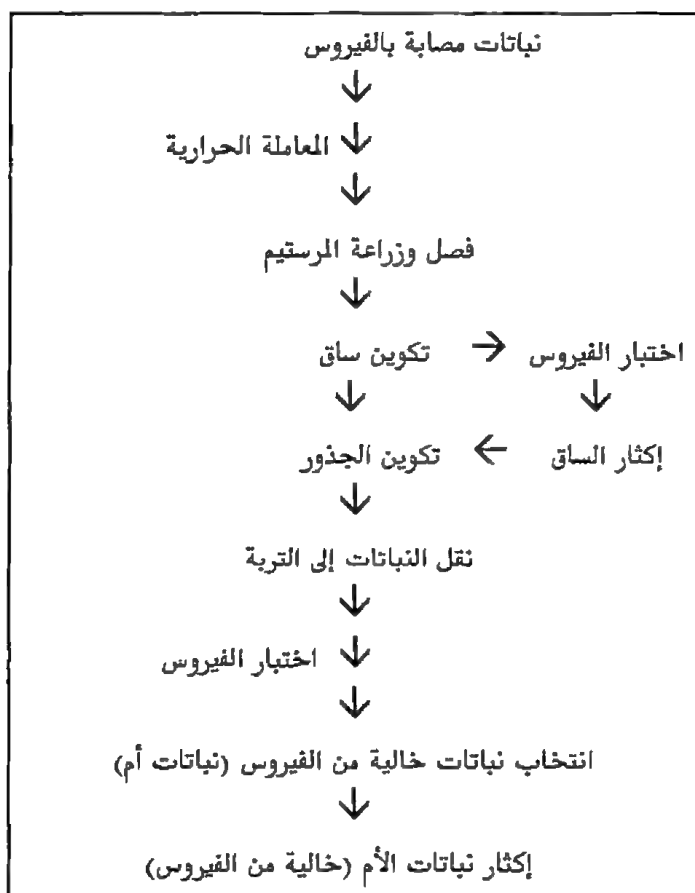
يختلف كثيرا المحتوى الكيميائى للبيئة المناسبة لزراعة المرستيم باختلاف مرحلة نموه، إن كانت لإنتاج نباتات أو جذور وباختلاف النوع والصنف النباتى. لذلك يفضل الاستفادة من خبرة السابقين فى اختيار البيئة المناسبة أو يقوم الباحث بنفسه بتحديد البيئة المناسبة.

يزرع المرستيم عادة فى بيئة صلبة وأحيانا فى بيئة سائلة مع استخدام كبار ورقية لتثبيته. وتضبط الحموضة عند 5.4-6 pH، ويضاف إليها السكروز بنسبة ٢-٥ ٪ (وزن/حجم) وبعض الفيتامينات مثل Vitamin-B1; Pyridoxin; Panthothenic; Nicotinic acid. وتضاف الأكسينات والسيبتوكاينينات بتركيزات ١,٥ - ٠,٥ ملليجرام/ لتر لأهميتها فى تنشيط انقسام الخلايا. ويضاف الجبرلين GA₃ أحيانا لتشجيع استطالة الجذر. ويضاف السيبتوكاينينات أحيانا فى مرحلة متأخرة وليس بعد فصل المرستيم مباشرة لبعض النباتات مثل البيلارجونيم Pelargonium لتلافى ظهور اللون البنى الذى تسببه السيبتوكاينينات (Morel, 1964; Debergh and Maene, 1977).

الظروف البيئية المحيطة

تحضن المرستيمات بعد زراعتها عند ٢١-٢٥ م° و ١٤-١٦ ساعة يوميا ضوء فلوروسنت شدته ٨-١٢ وات/ م^٢. وتحتاج معظم نباتات الأبصال إلى حرارة أقل. وقد تستخدم لمبات أقل قوة فى الأيام الأولى من زراعة المرستيم (Debergh and Maene, 1977; Styer and Chin, 1983).

خطوات إنتاج نباتات خالية من الفيروس



c.f. Pierik, R.L.M. 1987

٢- زراعة مرستيم مفصول من نبات معملي

يستخدم المرستيم الطرفي المفصول من نباتات أو أبصال معملية أو أجنة ناتجة من نسيج النيووسيلة أو مرستيمات لبزاعم زهرية لنبات القنبيط الناتج في المعمل

لإنتاج نباتات خالية من الفيروس ، وقد ثبت نجاح هذه الطريقة في الحصول على نباتات تبغ وعنب وليمي وجلاديولس وموالح خالية من فيروس Tobacco mosaic virus (TMV) (Mori, et al, 1982).

٣ - زراعة كالس أو بروتوبلاست

يستطيع الكالس الهروب من الإصابة الفيروسية لسرعة انقسامه وعدم احتوائه على قدر كافٍ من المواد الغذائية اللازمة لنمو وتكاثر الفيروس. وتكرار الزراعة الثانوية لكالس نبات التبغ والبطاطس يؤدي إلى إنتاج كالس خالي من فيروس البطاطس Po-tato X- virus. وأمكن الحصول على كالس ونباتات خالية من الفيروس من زراعة متوك نبات Pelargonium. وتم عزل بروتوبلاست من مناطق داكنة الاخضرار من أوراق نبات تبغ كانت مصابة بفيروس (TMV). ونتج عن هذا البروتوبلاست نباتات خالية من الفيروس (Mori, et al., 1982). وفي الواقع أن إنتاج نباتات خالية من الفيروس من الكالس والبروتوبلاست لها أهمية عملية لمربي النباتات لحدوث تغييرات وراثية ونسبة إطفار عالية.

٤- تطعيم المرستيم على أصول جذرية خالية من الفيروس

يساعد التطعيم Micro-grafting على إنتاج نباتات معملية خالية من الفيروس خصوصا للأنواع الخشبية التي يصعب عليها تكوين الجذور في المعمل. ويتم التطعيم بنباتات معملية خالية من الفيروس على شتلات أصول جذرية عمر ٢٠ - ٤٠ يوما تعرضت لحرارة ٣٧ - ٣٨ م°. ويفضل ألا يزيد عمر شتلات الأصول الجذرية عن بضعة أشهر. ويمكن إكثار هذه النباتات مستقبلا بفصل براعم من النموات الجديدة ثم تطعم على شتلات أصول جذرية خالية من الفيروس (Fridlund, 1980). وبهذه الطريقة تم الحصول على كرمات عنب خالية من الفيروس بعد تطعيمها على أصول جذرية عرضت لحرارة ٣٥ م° لمدة ٢١ يوما، وتم بالتطعيم أيضا الحصول على نباتات

داليا Dahlias خالية من الفيروس وذلك بتطعيم نباتات داليا معملية بدون جذور وخالية من الفيروس على شتلات داليا كاملة النمو وخالية أيضا من الفيروس. وإذا كانت نباتات الداليا المعملية متقدمة في العمر ولم تتكون عليها جذور، فيمكن فصل عقل منها ثم تطعم على شتلات خالية من الفيروس. فإذا تكشف منها غصن واحد خالٍ من الفيروس فيمكن تنشيط نمو البراعم الجانبية عليه والحصول منه على أفرع جديدة خالية من الفيروس. وبتكرار الزراعة المعملية للأفرع الجديدة يمكن الحصول على أعداد كثيرة منها يمكن استخدامها في تطعيمات جديدة. وتنخفض نسبة نجاح المرستيمات المطعمة على نباتات خالية من الفيروس إذا أصيبت بالفيروس أو تعرضت للجفاف أو كانت البيئة الغذائية غير مناسبة أو كانت ساكنة (Morel, 1964). وبهذه الطريقة تم إنتاج نباتات موالح ومشمش وعنب وخوخ وتفاح وكافور وكاميليا خالية من الفيروس.

الكشف عن الفيروس Virus identification

١- استخدام نباتات اختبارية كاشفة Test plants

تستخدم نباتات كاشفة يظهر عليها بسهولة مظاهر الإصابة بالفيروس مثل *Che-nopodium quinoa*; *Comphrena globosa*; *Chenopodium amaranticolor* وأنواع التبغ Tobacco. حيث تجمع عصارة من النبات المراد اختباره، وتلوث بها ورقة على نبات كاشف بعد معاملتها بمسحوق Corborundum لإحداث جروح بها. ويحتاج هذا الاختبار فترة طويلة حتى تظهر أعراض الإصابة.

٢- استخدام الميكروسكوب الإلكتروني Electron microscope

يستلزم لهذه الطريقة توفير جهاز ميكروسكوب إلكتروني ومهارة من العاملين على استعمال الجهاز للكشف عن الفيروسات. ولهذا الجهاز كفاءة عالية في التعرف إلى الإصابة الفيروسية حتى ولو كانت العينة النباتية منخفضة الإصابة بالفيروس.

٢- استخدام جهاز Immuno Capture Polymerase Chain Reduction (IC-PCR)

تعتبر من أكثر الطرق حساسية للكشف عن الكثافة العالية والمنخفضة للفيروس بالمقارنة بغيرها من الطرق الأخرى المستعملة مثل:

1. PCR = Polymerase Chain Reaction
2. DAS-ELISA = Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.
3. IC-PCR = Immuno Capture – Polymerase Chain Reaction.

الكشف عن فيروس تورد القمة في الموز

فيروس تورد القمة (Banana Bunchy Top nanavirus (BBTV من أخطر الأمراض التي تصيب الموز في العالم. وينتشر في لحاء النبات بتركيز منخفض، وحشرة المن *Pen talonia nigronervosa* من أهم الحشرات الناقلة للفيروس. وللكشف عن الفيروس تؤخذ عينة وزنها ٠,١ جرام من العرق الوسط للورقة ثم تحفظ في واحد مليلتر منظم فوسفات ملحي (Phosphate-buffer saline (PBS يحتوى على ٠,٥ مولر فوسفات رقم حموضته ٧,٤ ومضاف إليه ٠,١٤ مولر كلوريد صوديوم. وثبت أن جهاز IC-PCR من أكثر الأجهزة حساسية للكشف عن الفيروس في تركيزاته المرتفعة والمنخفضة في عصارة العرق الوسط لنبات الموز بالمقارنة بغيره من الأجهزة مثل DAS-ELISA و PCR (Sadik, 1994).

(ب) إنتاج نباتات خالية من الفطريات

تنتشر جراثيم الفطر في الهواء والتربة. وبسقوط جرثومة على بيئة مناسبة تمتص منها الماء وتنبت منها أنبوبة جرثومية. وتعتمد الجرثومة في هذه المرحلة على ما يحتويه جسمها من مواد غذائية حتى تتمكن من العائل. وتعمل مصاتها Ap- pressorium على تثبيت الميسليوم أثناء نموه وانتشاره. وقد يخترق الميسليوم بشرة النبات مباشرة عن طريق الضغط الميكانيكي أو بإفراز الإنزيمات المحللة للجدار

الخلوى. وتستمر الأنبوبة الجرثومية فى نموها حتى تخترق فتحة ثغر ثم تنتشر بين خلاياه وترسل ممصاتها داخلها لتتناول غذاءها.

وتستخدم زراعة المرستيم بنجاح فى إنتاج نباتات خالية من بعض أنواع البكتيريا مثل *Xanthomonas*; *Bacillus*; *Pseudomonas*; *Erwinia* وبعض أنواع الفطريات مثل *Phialophora*; *Rhizoctonia*; *Verticillium*; *Fusarium*. وإنتاج نباتات قرنفل خالية من فطر *Fusarium roseum f. cerialis* وفطريات *Fusarium oxysporum* *Pseudomonas carophylli*; *Pecto-* وبكتريا *f. dianthi*; *Phialophora cinerescens* *bacterium parthenii*. وبزراعة المرستيم يمكن إنتاج نباتات جلاديولس خالية من فطر *Fusarium oxysporum f. gladioli* وهو مرض خطير يصيب الجلاديولس، وإنتاج نباتات *Pelargonium* خالية من بكتريا *Xanthomonas pelagonii*، ونباتات بيجونيا *Begonia elatior* خالية من بكتريا *Xanthomonas begoniae*. ونباتات فراولة خالية من فطر *Phytophthora fragariae*.

درجات مقاومة النباتات للأمراض

١- نباتات منيعة Immune plants

نباتات لا تظهر عليها أعراض الإصابة بالمرض بالرغم من توفر الظروف الملائمة لنموه وانتشاره. ولا توجد نباتات منيعة ضد جميع الأمراض، بل قد يكون منيعا ضد مرض معين دون غيره.

٢- نباتات مقاومة Resistant plants

نباتات تظهر عليها أعراض الإصابة بدرجة محدودة ولا تؤثر على نموها وإنتاجيتها. وقد يرجع ذلك إلى:

- صغر حجم الثغور، وقدرة النبات على قفل الثغور بسرعة عند حدوث الإصابة، أو قدرة النبات على شغل غرفة الثغر بخلايا برانشيمية، أو سرعة التئام الجروح.

- وجود شعيرات أو طبقة سميكة من الكيوتين على أسطح النبات تعوق الأنبوبة الجرثومية من اختراق الأنسجة.
- وجود مواد كيميائية سامة تؤثر على نمو الميكروب وتوقف نموه.
- ارتفاع الضغط الأسموزي لبروتوبلاست النبات عن بروتوبلاست الميكروب فلا يستطيع الحصول على غذائه من خلايا النبات.
- عدم وجود مواد غذائية يحتاجها الميكروب مثل بعض الفيتامينات أو الأملاح فيتوقف نموه.
- عدم ملائمة درجة حموضة البروتوبلاست لنمو الفطر.

٣- نباتات قابلة للإصابة (حساسة) Susceptible plants

نباتات تظهر عليها الإصابة بشدة وتؤثر على نموها وإنتاجيتها.

٤- نباتات شديدة القابلية للإصابة Very susceptible plants

نباتات تموت خلاياها بمجرد وصول ممصات الفطر إليها.



الباب السابع

إنتاج نباتات أحادية فى العمل

In vitro Production of Haploids

الأعضاء المذكرة فى النبات

هى مجموعة من الأسدية Stamens موجودة فى الزهرة. وتتكون السداة من خيط Filament ومنتك Anther. ويتكون المتك من فصين كبيرين مفصولين من الداخل بحاجز. ويحتوى كل فص على حجرتين يفصلهما نسيج فاصل. ويحتوى كل فص على كيس جرثومى بداخله حبوب اللقاح. وجميع خلايا الأنسجة الضامة والفاصلة بين حجرات وجدر المتك هى خلايا جسمية ثنائية العدد الكروموسومى. بينما حبوب اللقاح هى خلايا أحادية العدد الكروموسومى. وينتج عن الزراعة المعملية للمتك نباتات ثنائية مصدرها خلايا الأنسجة الضامة والفاصلة بالمتك ونباتات أحادية مصدرها حبوب اللقاح. وتنشأ حبوب اللقاح فى المتك من خلايا أمية Pol-len mother cells موجودة فى الطبقات الداخلية لجدر الأكياس الجرثومية. وتنقسم الخلية الأمية انقساماً اختزالياً Meiosis إلى خليتين أحاديتين Haploid، ويسمى دور الخليتين Dyad. ويتبع ذلك انقساماً عادياً Mitosis ليكون أربع خلايا أحادية، ويسمى دور الأربع Tetrad. وبذلك ينتج عن كل خلية أمية واحدة أربع حبوب لقاح. ثم تتفكك خلايا حبوب اللقاح (Pollen grains (Microspores جاهزة للتلقيح والإخصاب. وحببة اللقاح خلية كروية أو بيضاوية أو مضلعة لونها أصفر غالباً لها جدار خارجى عادة سميك عليه تجاعيد وأشواك مميزة لكل نوع نباتى. وحببة اللقاح بداخلها مادة هلامية عكرة تحتوى على مواد غذائية فى صورة حبيبات. وقبل انتشار حبوب اللقاح من المتك تنقسم نواة حبة اللقاح إلى نواتين تتميز إحداها بكثافة السيتوبلازم المحيط بها، وتسمى نواة جنسية Generative nucleus أو خلية

تناسلية وتبقى صغيرة بدون جدار، بينما النواة الأخرى كبيرة وتسمى نواة خضرية
.Vegetative nucleus

الأعضاء المؤنثة فى النبات

يمثل المتاع Gynaecium عضو التانيث بالزهرة فى نباتات مغطة البذور Angio-sperms. ويتكون المتاع من كربلة واحدة أو عدة كرايل. وتتركب الكربلة Carpel من جزء قاعدى يعرف بالمبيض Ovary ويعلو المبيض خيط رفيع يعرف بالقلم Style. ويوجد فى الطرف العلوى للقلم جزء منتفخ يسمى بالميسم Stigma. والميسم جسم كروى صغير وبرى أو أملس مغطى بطبقة لزجة لاقتناص حبوب اللقاح. ويحتوى المبيض على بويضة Ovule واحدة أو أكثر. وتقوم البويضة بوظيفة الخلية التناسلية الأمية، فيها ينشأ الجنين بعد الإخصاب أو هى الكيس الذى يحتضن الجنين بداخله. ولذلك تسمى البويضة علميا بالخلية الأمية للكيس الجنينى Embryo-sac mother cell مثلها مثل الخلية الأمية لحبوب اللقاح. وتتركب البويضة أساسا من نسيج النيوسيلة Nucellus محاطا غالبا بغطاء من الخارج متكون من غلاف أو غلافين ماعدا منطقة خاصة يتكون فيها النقيير Micropyle وقد يكون نسيج النيوسيلة بدون أغلفة. وحيث إن البويضة وظيفتها تناسلية فلا بد وأن تدخل فى انقسام اختزالى (ميوزى) لتكوين خليتين Dyad، ثم انقسام عادى (ميوزى) للوصول إلى دور أربع الخلايا Tetrad، وهى النتيجة النهائية للانقسام الاختزالى. وتحتوى كل من الخلايا الأربع على نصف العدد الأصلى من الكروموسومات. ثم تهضم ثلاث من الخلايا الأربع وتبقى خلية واحدة فقط فى المبيض وتعتبر نواة أنثوية حقيقية تبدأ فى تكوين الكيس الجنينى. وتنقسم النواة الأنثوية الحقيقية إلى ثلاث انقسامات بطريقة الانقسام العادى Mitosis ليتكون بعدها ثمانى أنوية جميعها مختزلة، أى تحتوى على نصف عدد كروموسومات الخلية الجسمية. ويحدث بعدها توزيع للثمانى أنوية فى فراغ الكيس الجنينى، فتتجه ثلاث منها نحو أحد أقطاب الكيس الجنينى وتسمى بخلايا Antipodal. وتتجه ثلاث أخرى نحو القطب الآخر حيث تمثل خلية منهم الخلية الأنثوية الحقيقية True female egg

وتسمى الخليقتان بالخلايا المنشطة Synergetic cells. وتبقى نواتان من ثمانى الأنوية، وهاتان تندمجان معا لتكونا نواة ثنائية العدد الكروموسومى وتسمى بالنواة المندمجة Fusion nucleus أو النواة القطبية Polar nucleus وبعد انتهاء هذا التوزيع يصبح الكيس الجنينى مؤهلا لاستقبال حبوب اللقاح. وزراعة البويضة معمليا قبل إخصابها يؤدي إلى إنتاج نبات أحادى العدد الكروموسومى. وبمضاعفة عدد الكروموسومات فيها تنتج نباتات مماثلة لنبات الأم. وزراعة المبيض أو البويضة أو الكيس الجنينى بجميع محتوياتهم سيؤدي إلى إنتاج نباتات مختلفة فى عدد الكروموسومات، إذ يؤدي إلى إنتاج نباتات ثنائية من الخلايا الثنائية ونباتات أحادية من الخلايا الأحادية.

التلقيح والإخصاب

تنقل حبة اللقاح إلى الميسم، وتسمى بعملية التلقيح Pollination. ثم تنبت حبة اللقاح مكونة أنبوبة لقاحية Germ tube تخترق نسيج الميسم ثم القلم متجهة نحو المبيض ثم الكيس الجنينى ثم البويضة. وعند بدء إنبات حبة اللقاح على الميسم أو قبل ذلك مباشرة تنقسم الخلية الجنسية (الذكورية) إلى خليتين Dyad. وعند وصول طرف أنبوبة اللقاح إلى البويضة تختفى عادة النواة الخضرية Vegetative nucleus. ثم تفرغ أنبوبة اللقاح محتوياتها فى الكيس الجنينى فتندمج إحدى الأنوية الذكورية مع البويضة (النواة المؤنثة الحقيقية)، ويسمى ذلك بالاندماج أو الإخصاب Fertilization، وتنتج نواة الزيجوت Zygote التى تحتوى على عدد من الكروموسومات يساوى الموجود فى الخلية الجسمية. أما النواة الذكورية الثانية فتندمج مع النواة المندمجة القطبية Polar nucleus وينتج عن هذا الاتحاد نواة واحدة هى نواة الإندوسبرم Endosperm تحتوى على ثلاثة أضعاف العدد الأساسى من الكروموسومات، لأنها تنشأ من اتحاد ثلاث أنوية تحتوى كل منها على نصف العدد الأساسى من كروموسومات الخلية الجسمية. وبانتهاء الإخصاب وتكوين الجنين (الزيجوت) واكتمال نمو الجنين يكون قد اكتمل تكوين البذرة.

تعريف النباتات الأحادية Haploid plants

يعرف النبات الناتج من الطور الجرثومي Sporophyte (حبة لقاح أو بيضة) بأنه نبات أحادي Haploid عقيم تحتوى خلاياه على نصف العدد الكروموسومى الموجود فى الخلية الجسمية. والنبات الأحادى قد يكون مصدره حبة لقاح ويسمى نشوءا ذكريا -Androgene- sis، أو مصدره بيضة غير مخصبة ويسمى نشوءا أنثويا Genogenesis أو نشوءا بكريا -Par- thenogenesis; Apomixes. وتضاعف عدد الكروموسومات فى النباتات الأحادية يؤدي إلى إنتاج نباتات متضاعفة Polyhaploids أى إنها نباتات متضاعفة ومصدرها نباتات أحادية. وهى نباتات خصبة منتجة للبذور. وبدأت تجارب زراعة المتوك عام ١٩٧٠ على الأرز والقمح فى الصين، ثم امتدت التجارب إلى الذرة والشوفان والتريتيكال والتبغ والقطن وفول الصويا والشلجم والكرنب الصينى والفلفل وبعض الأشجار والشجيرات وكثير من نباتات الزينة. وشملت زراعة المتوك وحبوب اللقاح الآن أكثر من ١٧١ نوعا نباتيا ينتمون إلى ٦٠ جنسا و٢٦ عائلة نباتية. ومازالت تحتاج إلى مزيد من البحث لحل بعض الصعوبات التى تواجه إنتاج النباتات الأحادية لبعض المحاصيل.

أهمية النباتات الأحادية

١- إنتاج سلالات نقية

يمكن الحصول على سلالات نقية بطرق تقليدية تشمل التهجين والتلقيح الذاتى أو الرجعى لعدة أجيال مع الانتخاب للتخلص من الصفات غير المرغوبة. ويؤخذ على هذه الطريقة أنها تحتاج إلى مجهود وفترة زمنية طويلة. بينما زراعة المتوك أو حبوب اللقاح أو البيضة فى المعدل يمكن إنتاج نباتات أحادية العدد الكروموسومى Haploid، فإذا عوملت النباتات العملية الأحادية بالكولشسين يتضاعف عدد الكروموسومات فيها وتنتج سلالات ثنائية Dihaploid خصبة متجانسة Homozygous وثابتة وراثيا Isogenic فى وقت قصير. وقد أنتجت سلالة ذرة "Qun-Hua" بزراعة المتوك فى فترة تقل عشر سنوات بالمقارنة بإنتاج سلالة مماثلة فى التجانس بالطرق التقليدية.

وتميزت هذه السلالة بارتفاع المحصول وقدرة عالية على التوافق الهجينى حيث أدخلت فى إنتاج ٦٢ هجيناً، تميز منها ٥٦ هجيناً بارتفاع المحصول، وقد تفوق الهجين Qun (411 x Hua) عليهم جميعاً (Wu, et al, 1980).

٢- استحداث تنوع وراثى فى النباتات الأحادية المتضاعفة

نباتات الأرز الناتجة من الجيل الأول «F1» للهجين «Jili x Xian nong 5675» هى نباتات ثنائية غير متجانسة لأنها تحتوى على جينات متجمعة من الصنفين. وبالزراعة العملية لحبوب لقاح الجيل الأول (F1) نتجت نباتات فى الجيل الأول (H1) مختلفة فى تركيبها الوراثى. وبمضاعفة العدد الكروموسومى لهذه النباتات ظهرت ٧ تكوينات وراثية، بعضها يحمل صفات الصنف الأول وبعضها يحمل صفات الصنف الثانى، والبعض الآخر جمع بين صفات الصنفين Institute of ge-netics 1974, 1977b) (شكل ١).

شكل (١) مقارنة بين برنامج تربية نباتات أحادية وبرنامج تربية تقليدية

برنامج تربية تقليدية	برنامج تربية للنباتات الأحادية
نبات الأم X نبات الأب	نبات الأم
↓	↓
F1	زراعة حبوب لقاح أو متوك أو بيضة
↓	↓
F2 - 5	→ إنتاج نباتات أحادية ←
التلقيح الذاتى أو	↓
التجهين الرجعى مع الانتخاب	تضاعف ذاتى تضاعف بانكولشمين
↓	↓
↓	→ H1 ←
F6	نباتات ثنائية متجانسة
سلالات ثابتة وراثياً	↓
	H2

٢- استحداث أصناف جديدة من الأرز والقمح والتبغ

بزراعة متوك الجيل الأول الهجين (F₁) من الأرز والقمح والتبغ تم الحصول على :
(أ) صنفين من الأرز هما (Hua Yu No.-1) و (Hua Yu No.-2) يتميزان بمحصول مرتفع من الحبوب (٧٥٠٠ كيلوجرام/ هكتار) ومقاومة لللفحة البكتيرية Bacterial blight والتأقلم للبيئة بدرجة عالية. وصنفين آخرين هما (Xin Xiu) و (Tang Huo) (No.-2) يتميزان بارتفاع المحصول. (Chen and Li, 1978)

(ب) سلالة جديدة من القمح الشتوى تسمى (Jingdan-2288) تتميز بسنابل كبيرة وارتفاع محصول الحبوب وقوة نمو الأشطاء ومقاومة مرض الصدأ المخطط Stripe rust والبياض الدقيقى Powdery mildew وقصر الساق ومقاومة الرقاد (Insti-tute of genetics, China, 1977b).

(ج) الصنف (Danyu No.-1) من التبغ متفوق بجداره على آيائه فى المحصول ومقاومة الأمراض. واستغرق ٣ سنوات من زراعة حبوب لقاح الجيل الأول الهجين حتى تم توزيعه على المزارعين (Institute of Tobacco, Shantung, China, 1974a).

٤- رفع كفاءة الانتخاب للصفات المتنحية

تحتوى النباتات الأحادية على طاقم واحد من الكروموسومات ، لذلك فإنها ثابتة وراثيا أى إن صفاتها السائدة تظل سائدة والمتنحية تظل متنحية ، والتعبير الوراثى للصفات الوراثية شديد التباين. فمثلا تهجين الصنف Sonora-62 من القمح ذات الحبوب الحمراء مع الصنف Hongtu ذات الحبوب البيضاء كانت حبوب الجيل الأول (F₁) الناتجة حمراء اللون، لأن اللون الأحمر سائد على اللون الأبيض. وفى الجيل (F₂) تم الحصول على ٤١٣ نبات منهم ٣١٣ نبات حبوبه حمراء و ١٠٠ نبات حبوبه بيضاء، وكانت نسبة الانعزال (١ : ٣ : ١). وأوضحت هذه التجربة أن تربية النباتات الأحادية من الممكن أن ترفع كفاءة الانتخاب للصفات المتنحية مع سهولة التخلص من الكايميرا (Institute of genetics 1974 , 1977b).

٥- إنتاج نباتات مذكرة

يمكن الحصول على نباتات مذكرة من الذرة والأسبرجس *Asparagus*. وتتميز نباتات الأسبرجس المذكرة على النباتات المؤنثة في إنتاج محصول المهاميز (الطرف القمي من الساق وهو الجزء الصالح للغذاء)، كما أن النباتات المذكرة تعمر أطول من النباتات المؤنثة (Wu, et al, 1980).

٦- سهولة استحداث الطفرات في المزارع الأحادية

يعتمد نجاح تحسين أى محصول على مقدار التغيرات الوراثية المتوفرة مع انتخاب الأفضل من هذه التغيرات. ويعتبر الإشعاع والطفرات الكيميائية وسائل ناجحة في إحداث تباينات وراثية. وتعتبر مزارع الكالس الغنية بالسيتوكاينينات مصدرا هاما أيضا للحصول على تباينات وراثية. وتيسر زراعة الخلايا الأحادية دراسة وراثية الخلايا الجسمية، لأنه في بعض الحالات قد تكون للطفرة الخلوية *Mutant cell lines* أهمية خاصة. والطفرات الناتجة من معظم الخلايا الأحادية ليس لها تعبير جيني لأنها طفرات متنحية. ويمكن استخدام خلايا الكالس أحادية العدد الكروموسومي في دراسة تأثير بعض الطفرات مثل الإشعاع والكيميائيات، وقد تميزت في ذلك الخلية الأحادية وحبوب اللقاح على المتوك، حيث تؤدي زراعة المتوك إلى إنتاج نباتات أحادية *Haploids* بجانب نباتات مختلفة التضاعف. وتستخدم مزارع الخلايا الأحادية ومزارع البروتوبلاست بنجاح في عزل خلايا طافرة *Mutant cell lines* لأنواع نباتية عديدة مقاومة للضاد الحيوى ستربتومايسين وطفرات مقاومة لمركب *5-Brqmodeoxy- uridine* (Maliga, et al., 1973) وطفرات مقاومة لمركب *Mc-thionine sulfoximine* وطفرات مقاومة لنيماتودا البطاطس وطفرات مقاومة لدرجات حرارة مختلفة (Wenzel and Uhrig, 1981). كذلك تم الحصول على طفرات بتعرض نباتات تبغ حديثة العمر، ناتجة من زراعة المتوك، إلى جرعات من ١,٥ إلى ٣ كيلوراد من أشعة جاما. وأظهرت هذه الطفرات نسبة عالية من التغيرات الوراثية في الشكل

والحجم ولون الزهرة وبعضها كانت كاييميرا مؤكدة. وفتجت طفرة أزهارها بيضاء بعد زراعة متوك نبات التبغ على بيئة مضاف إليها ^{14}C -مولر من مادة (Nitsch and Devreux and Sac- 1969) N-3-Nitrophenyl-N-Phenylurea Nitsch (1971) cardo بتعريض براعم زهرية للصنف Virginia Bright من التبغ *Nicotiana tabacum* إلى الجرعة واحد كيلوراد من أشعة X- ثم زرعت المتوك بعد فصلها من الأزهار المشعة على بيئة غذائية وكانت النتيجة أن ظهرت تشوهات كروموسومية بنسبة ٦٪. كذلك بتطبيق زراعة المتوك أمكن استحداث تغييرات وراثية فى العديد من النباتات وانتخبت سلالات منها وأصبحت بعد ذلك أصنافا تجارية. فمثلا فى الصين استحدثت أصنافا جديدة من الأرز تسمى Tanfong-1 (Yin, et al., 1976) و Huagu-1 و Huagu-2 ومن القمح تسمى Lunghua-1 و Huapei-1 ومن التبغ تسمى Tanyu-1 (Hu, et al., 1978) و Tanyu-2 و Tanyu-3. وفى اليابان استحدثت صنف F-211 من التبغ مقاوم للذبول البكتيرى من خلال زراعة المتوك.

إنتاج نباتات أحادية من حبوب اللقاح

أهمية زراعة حبوب اللقاح

- ١- يفضل زراعة حبوب اللقاح لتجنب الصعوبات الناتجة عن صلابة جدر متوك بعض الأنواع النباتية.
- ٢- النباتات الناتجة من حبوب اللقاح متجانسة بعد تضاعف كروموسوماتها بالكولشسين، ولا ينتج عنها انعزالات وراثية، وأن حوالى ٩٠٪ من السلالات الناتجة هى سلالات ثنائية لها تعبير جينى متجانس. بينما النباتات الناتجة من زراعة المتوك تحتوى على نباتات أحادية مصدرها حبوب اللقاح ونباتات ثنائية مصدرها جدر المتك والأنسجة الضامة به.
- ٣- تعطى حبوب اللقاح جنينا ذكريا مباشرة. وهذا يسهل الدراسة وتتبع التغيرات الوراثية والفسيولوجية والبيوكيميائية للأجنة الذكورية الناشئة مثل متابعة مراحل

تكوين الأجنة من حبوب اللقاح ابتداء من تكوين الخلية الفردية *Uninucleus* ،
ودراسة الامتصاص *Uptake* والتحول الوراثي *Transformation* وتأثير المطفرات مثل
المطفرات الكيميائية والفيزيقية مثل أشعة جاما وأشعة X-.

خطوات زراعة حبوب اللقاح *Pollen grains culture*

فصل حبوب اللقاح

١- بالنسبة للأزهار الكبيرة مثل أزهار الداتورا *Datura innoxia* والبيتونيا *Pe-tunia hybrida* ، تفصل حبوب اللقاح من متوك طازجة. وتتم هذه الخطوة داخل
كابينة معقمة.

٢- بالنسبة للأزهار الصغيرة، تعقم البراعم الزهرية أو النورات تعقيمًا سطحيًا.
وتفصل المتوك وتوضع في الدورق الزجاجي الخاص بجهاز المجنس *Homogenizer*
يحتوى على بيئة سائلة ، ويفضل استخدام دوارق زجاجية نوع *Potter-Elvehjem* ،
وبذلك يمكن الحصول على حبوب لقاح معلقة فى بيئة سائلة ومعها بقايا جدر
المتك. ومن الضروري بالنسبة لنبات التبغ *Nicotiana tabacum* زراعة المتوك فى
بيئة سائلة لمدة ٤-٦ أيام قبل فصل حبوب اللقاح. ويرشح المحلول لفصل حبوب
اللقاح عن بقايا جدر المتك ، ويستخدم لذلك قماش نايلون مساميته دقيقة تسمح
بمرور البيئة السائلة ومعها حبوب اللقاح فقط.

٣- توضع حبوب اللقاح المعلقة فى بيئة سائلة فى جهاز طرد مركزي يعمل
بسرعة (١٥ x g) لمدة أربع دقائق. ثم يتم التخلص من معظم البيئة السائلة إلا القليل
منها المحتوى على حبوب لقاح متجمعة. ثم يضاف إليها بيئة سائلة طازجة لغسل
حبوب اللقاح. وتكرر هذه الخطوة عدة مرات مع الحرص على إضافة بيئة جديدة
طازجة كل مرة لضمان حسن غسل حبوب اللقاح.

٤ - تنقل حبوب اللقاح مع كمية بسيطة من البيئة السائلة إلى دوارق الزراعة
المعقمة المحتوية على بيئة سائلة طازجة ، وقد تستخدم بيئة صلبة طازجة بدلا

من البيئة السائلة. ويفضل في حالة الزراعة في بيئة سائلة استمرار تحريك دوارق الزراعة بصورة بطيئة لضمان انتشار حبوب اللقاح فيها، وإن كانت عملية تحريك دوارق الزراعة ليست ضرورية مع بعض النباتات مثل *Datura* والتبغ *Nicotiana*.

تحفيز حبوب اللقاح

١- ثبت أن غياب منظمات النمو من البيئة يؤدي إلى تحفيز حبوب اللقاح لتكوين أجنة، بينما إضافتها للبيئة يؤدي إلى تكوين قليل من الكالس بجانب الجنين.

٢- لزراعة حبوب لقاح التبغ *Nicotiana tabacum* تستخدم بيئة تحتوى على أملاح العناصر المعدنية المذكورة في بيئة (H) Bourgin and Nitsch, 1967 مضافا إليها الحديد لتحفيز حبوب اللقاح على النمو. ثم تنقل حبوب اللقاح بعد ذلك إلى بيئة طازجة مضافا إليها ٨٠٠ ملليجرام/ لتر جلوتامين + ١٠٠ ملليجرام/ لتر سيرين + Serine ٥٠٠٠ ملليجرام/ لتر إينوسيتول + Myo-Inositol + أملاح العناصر المعدنية بقدر يعادل أربعة أمثال تركيزها الأساسي في البيئة الغذائية (H) (جدول ١).

٣- يمكن دفع حبوب لقاح الداتورا *Datura innoxia* للنمو بزراعتها في بيئة تحتوى على أملاح العناصر المعدنية + ٢٪ سكروز ثم تحضن عند ٢٥ - ٣٠ م°، ويبدأ انقسام الخلايا بعد ٢٤ ساعة من الزراعة. وبعد ٧٢ - ٩٦ ساعة يزداد انقسام الخلايا ويبدأ تخصصها وتكوين أجنة ثم تنمو الأجنة إلى نباتات.

٤- يزداد نشاط تكوين الأجنة من حبوب اللقاح أو المتوك كثيرا برفع تركيز السكروز و Myo-Inositol في البيئة، حيث إن زيادة تركيز السكروز من ٠,٠٨٨ إلى ٠,١٨ مولر من العوامل الهامة لخروج النباتات من حبوب اللقاح والمتوك وله تأثير جيد على النمو وينظم الضغط الأسموزى للبيئة.

٥- التركيزات المرتفعة من أيونات الأمونيوم Amonium توقف تكوين الكالس الناتج من حبوب لقاح الشعير والأرز. وتحتوى بيئة (N6) على نسبة منخفضة من الأمونيوم وزيادة أيونات النترات Nitrate . لذلك تعتبر بيئة (N6) هي أكثر البيئات

كفاءة بالمقارنة ببعض البيئات الأخرى المستخدمة فى زراعة متوك الأرز والنجيليات الأخرى (Chu, et al., 1975) (جدول ٢ و٣).

٦- يضاف أحيانا مستخلص درنات البطاطس إلى بيئة «Mille's medium» لزراعة متوك التبغ. واستحدثت بيئة «Potato II medium» تحتوى على ١٠٪ مستخلص بطاطس + ٥٠٪ من قوة العناصر الكبرى للبيئة «WH» + أملاح حديد + ثايمين Thiamine بالتركيز المذكور فى بيئة (MS). وزيادة نسبة الثايمين فى هذه البيئة يشجع إنتاج الكالس (Institute of Genetics, 1977b) (جدول ٤).

جدول (١) المكونات الأساسية لبيئات غذائية خاصة بزراعة المتوك وحبوب اللقاح (ملليجرام/لتر)

المكونات	(MM) Modified Miller Chu, 1975	(M) Miller 1963	(0.5 MS) Murashige & Skooge 1962	(H) Bourgin & Nitsch, 1967	(K) Keller et al., 1975
KNO ₃	2830	1000	950	950	2500
NH ₂ NO ₃	-	100	825	720	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	463	-	-	-	134
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	-	347	-	-	-
CaCl ₂ · 2H ₂ O	166	-	220	166	750
KCl	-	65	-	-	-
MgSO ₄ · 7H ₂ O	185	35	185	185	250
KH ₂ PO ₄	400	300	85	63	-
NaHPO ₄ · H ₂ O	-	-	-	-	150
MnSO ₄ · 4H ₂ O	4.4	4.4	11.2	25	10
H ₂ PO ₄	1.6	1.6	3.1	10	3

تابع جدول (١)

المكونات	(MM) Modified Miller Chu, 1975	(M) Miller 1963	(0.5 MS) Murashige & Skooge 1962	(H) Bourgin & Nitsch, 1967	(K) Keller et al., 1975
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.5	1.5	4.3	10	2
KI	0.8	0.8	0.4	-	0.75
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	-	-	0.13	0.25	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	-	-	0.013	0.025	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	-	-	0.013	-	0.025
FeSO ₄ · H ₂ O	27.8	-	14	-	-
Na ₂ EDTA	37.5	-	19	37.5	-
NaFeEDTA	-	32	-	-	-
Sequestrene	-	-	-	Fe 330	40
Thiamine- HCL	1.0	0.1	0.05	0.5	10
Pyridoxin- HCL	0.5	0.1	0.25	0.5	1
Nicotinic acid	0.5	0.5	0.25	5.0	1
Folic acid	-	-	-	0.5	-
Biotin	-	-	-	0.05	-
Glycine	2	2	1	2	-
Glutamine	-	-	-	-	800
m- Inositol	-	-	50	100	100
Sucrose x 10 ³	50	30	30	20	100
pH	5.8	6	5.5	5.5	5.8

جدول (٢) محتوى بيئة (N6) من العناصر والحديد والسكروز والأحماض
الأمينية لزراعة متوك وحبوب لقاح النجيليات (Chu, 1978)

المكونات	التركيز	المكونات	التركيز
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.5 mM	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mM (Solution)
KNO_3	0.03 M	Glycine	0.027 mM
KH_2PO_4	3.0 mM	HCl-Thiamine	3.0 μM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.75 mM	HCl-Pyridoxine	2.4 μM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.13 mM	Nicotinic acid	4.1 μM
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.02 mM	Sucrose	0.15 M
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5.2 μM	Agar	0.1 – 1.0%
H_3BO_3	0.025 mM	PH	5.6
KI	4.8 μM		

□□□

جدول (٣) محتوى بيئة (N6) من الأكسينات والسيتوكاينينات
لزراعة متوك وحبوب لقاح النجيليات

إضافات مفيدة (μ M)	إضافات هامة (M)	السكرورز (M)	مرحلة نمو حبوب اللقاح	الهدف من الزراعة
5.4-11.0 NAA, 300-500 mg/l*	9.0 2,4-D	0.15	-Middle or late uninuclear	<u>Callus induction:</u> -Oryza sativa
*1.4-2.3 KIN, 500 mg/l LH, 0.55 mM myo- inositol, 0.4mg/l Vit. B,	9.0 2,4-D	0.23- 0.29	-Middle uni- nuclear	-Triticum, triticale, Secale
* 2.3 KIN, 500 mg/l CH or LH, 0.5% active carbon	9.0 2,4-D	0.35- 0.44	-Middle uni- nuclear	-Zea mays
*2.9 IAA or 1.1 NAA, + 2.3-4.6 KIN,	0	0.15	-Middle or late uninuclear	<u>Shoot from callus:</u> -Oryza sativa
*2.9 IAA or 1.1 NAA, + 2.3-4.6 KIN	0	0.23	-Middle uni- nuclear	-Triticum, triticale, Secale
*2.9 IAA or 1.1 NAA, + 2.3-4.6 KIN	0	0.23	-Middle uni- nuclear	-Zea mays

تابع جدول (٣)

إضافات مفيدة (μ M)	إضافات هامة (M)	السكرورز (M)	مرحلة نمو حبوب اللقاح	الهدف من الزراعة
--	0	0.088	-Middle or late uninuclear	<u>Pollen embryo and plantlet</u> -Oryza sativa
--	0	0.23	-Middle uni- nuclear	-Triticum, triticale, Secale
--	0	0.35	-Middle uni- Nuclear	-Zea mays

c.f. Chu, 1978

* LH = Lactalbumin hydrolysate

جدول (٤) مكونات بيئة البطاطس Potato II medium لزراعة متوك القمح

المكونات	التركيز	المكونات	التركيز
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.75 mM	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1 mM (Solution)
KNO ₃	9.9 mM	Aqueous potato medium	10%
KH ₂ PO ₄		Glycine	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.5 mM	Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	0.11 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.51 mM	Thiamine-HCl	3.0 μ M
MnSO ₄ .4H ₂ O	-	Pyridoxine-HCl	-
ZnSO ₄ .H ₂ O	-	Nicotinic acid	-
H ₃ BO ₃	-	Sucrose	0.26 M
KI	-	Agar	0.1 - 1.0%
KCl	-	PH	5.8
	0.5 mM		

c.f. Chu, et al., 1975

طرق زراعة حبوب اللقاح

تزرع حبوب اللقاح مباشرة فى أطباق بترى مثل زراعة الخلايا الفردية ويمكن زراعتها معلقة فى بيئة سائلة. وتستخدم إحدى الطرق الآتية لزراعة حبوب اللقاح وتكوين أجنة ذكرية Androgenesis.

١- طريقة الزراعة الحاضنة Nurse culture technique

تستخدم هذه الطريقة لزراعة حبوب لقاح نبات الطماطم *Lycopersicon esculentum*. حيث توضع المتوك على سطح البيئة الغذائية الأساسية الصلبة فى أطباق بترى ثم تغطى بقرص صغير من ورق الترشيح. ثم تضاف قطرات من البيئة الغذائية المعلق بها حبوب اللقاح على أقراص ورق الترشيح بمعدل ١٠ حبوب لكل قرص. ثم تحضن البيئة ومحتوياتها عند ٢٥°م مع وجود ضوء مستمر. وبعد ٢٨ يوما تقريبا تظهر عناقيد من خلايا خضراء بنسبة ٦٠٪ من حبوب اللقاح المنزرعة، وهى مستعمرات خلوية أحادية العدد الكروموسومى. وثبت من هذه التجربة أنه لا يمكن إنتاج الخلايا الخضراء فى حالة زراعة حبوب اللقاح بدون وجود المتوك فى البيئة الغذائية. وبالرغم من نجاح هذه الطريقة فى زراعة حبوب لقاح نباتات الطماطم، إلا إن تطبيقاتها العملية ما زالت قاصرة على بعض الأنواع النباتية (Sharp, et al., 1972).

٢- طريقة القطرة المعلقة Hanging drop

تستخدم هذه الطريقة لزراعة حبوب لقاح الكرنب *Brassica oleracea* وحبوب لقاح الهجين "*B. oleracea*, x *B. alboglabra*" (Kameya and Hinata 1970) ومضمونها:

- توضع قطرة من البيئة الغذائية مضاف إليها ماء جوز الهند، تحتوى القطرة على ٥٠ - ٨٠ حبة لقاح، على غطاء شريحة زجاجية Cover ثم يوضع هذا الغطاء مقلوبا على شريحة زجاجية مقعرة.

- يفضل تثبيت عمود صغير من شمع البرافين وسط الشريحة المقعرة، ثم يثبت غطاء الشريحة الحامل للقطرة المعلقة مقلوبا على الشريحة المقعرة، ثم تثبت الشريحة المقعرة مع غطاء الشريحة بشمع البرافين وترج الشريحة بحركة دائرية لتحسين التهوية. وبعد أربعة أسابيع تتكون عناقيد من الخلايا المنبثقة من حبوب اللقاح.

٣- طريقة نيتش Nitsch, 1974; 1977 method

تستخدم هذه الطريقة لزراعة حبوب لقاح التبغ *Nicotiana tabacum* وتشمل الخطوات التالية:

- تفصل المتوك وتزرع في بيئة سائلة تحت ظروف معقمة. ثم تحضن لمدة أربعة أيام عند ٢٧°م، بعدها تستخلص حبوب اللقاح من المتوك بواسطة جهاز المجنس Homogenizer، وتنقل إلى بيئة سائلة تحتوى على KNO_3 (٨,٩ مليمول) + NH_4NO_3 (٨,٩ مليمول) + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (٠,٧٥ مليمول) + CaCl_2 (١,٤٢ مليمول) + KH_2PO_4 (٠,٥ مليمول) + FeEDTA (١٠٠ مليمول) + Glutamine + Serine (٠,٩٥ مليمول) + Myoinositol (٠,٠٣ مول) + Ze- (٥,٥ مليمول) + atin (٠,٠٤٦ ميكرومول) + $\text{Indole Acetic Acid (IAA)}$ (٠,٥٧ ميكرومول) + Sucrose (٠,٢٣ - ٠,٠٦ مول).

- يرشح معلق الخلايا لفصل البيئة السائلة المحتوية على حبوب اللقاح والتخلص من بقايا جدر المتك، ثم يعامل الراشح المحتوى على حبوب اللقاح بالطرد المركزي لتكوين تجمعات عنقودية من حبوب اللقاح. ثم تفصل حبوب اللقاح وتغسل مرتين ببيئة سائلة باستخدام جهاز الطرد المركزي.

- تنقل حبوب اللقاح إلى بيئة سائلة طازجة لتكوين معلق خلايا كثافته حوالى ٥٠٠٠ حبة لقاح/ مليلتر.

- توزع أحجام متساوية (٢ مليلتر) من معلق الخلايا فى طبقات رقيقة فى أطباق بترى صغيرة أو دوارق سعة ٢٥ مليلتر. وتستخدم طريقة Bajaj, 1978a التالية إذا كان حجم معلق حبوب اللقاح صغيرا جدا.

٤- طريقة باجاج (Bajaj (1978a) method

- توضع قطرة من السليكون فى وسط طبق بترى معقم من البلاستيك قطره سنتمتر. ثم يوضع غطاء شريحة مقاس ٢٢ X ٢٢ ملليمتر بحذر فوق قطرة السليكون.
- توضع قطرة ٢٥٠ - ٥٠٠ ميكرو لتر من معلق حبوب اللقاح فوق غطاء الشريحة باستخدام ماصة ميكرومترية. وتغطى الأطباق بواسطة غشاء Parafilm - M، ثم تحضن لمدة ٤ - ٦ أيام تحت ضوء ضعيف (٥٠٠ لكس).
- تحضن الأطباق عند ١٤ ساعة ضوئية يوميا وشدة ضوئية ٢٠٠٠ لكس وحرارة ٢٨°م وتبقى حتى النهاية.

عوامل إنجاح زراعة حبوب اللقاح

١- غسل حبوب لقاح نباتات التبغ والداتورا جيدا بعد فصلها من المتوك خطوة هامة للتخلص من المواد المانعة لإنباتها، وتعريضها للبرودة قد يؤدي إلى انقسام ميتوزى Mitosis طبيعى وتكوين أنوية خضرية وتناسلية طبيعية وزيادة حيويتها، وقد تسبب تشوهات فى الانقسام الميتوزى الأول وتثبيط مراحل تطور الجاميطات واختلاف فى إنتاج الأجنة الذكرية. ولذلك يوصى بعدم تعريض حبوب اللقاح للبرودة (Bajaj, 1978).

٢- تتكون الأجنة الذكرية من حبوب اللقاح المفصولة من نيات التبغ عند أية مرحلة من مراحل نمو حبوب اللقاح ابتداء من مرحلة وحيدة النواة Uninucleus والانقسام الميتوزى الأول First mitosis حتى الطور الأخير من تكوين النواتين Late binucleus. وتنخفض نسبة النجاح بدرجة كبيرة كلما تقدمت حبوب اللقاح فى العمر. وزراعة حبوب اللقاح وهى فى مرحلة متوسطة أو متأخرة من النمو وعندها تحتوى على نوية واحدة Mid- or late- Uninucleus- microspores تؤدى إلى الحصول على أفضل عائد من النباتات الأحادية. وحيث إن المتك الواحد يحتوى على جميع أطوار النمو المختلفة لحبوب اللقاح، ابتداء من مرحلة الخلايا الأمية

المنشئة لحبوب اللقاح حتى مرحلة حبوب اللقاح كاملة النضج، فإن ذلك يؤكد إلى وجود تباين شديد في النباتات الناتجة من زراعة المتك. وقد تأكد ذلك بزراعة متوك القمح ومحاصيل أخرى (He and Ouyang, 1980) (جدول ٥).

جدول (٥) طور نمو حبوب اللقاح المناسب للزراعة المعملية

Species	Pollen grain stage	References
- <i>Hordeum vulgare</i>	-Uninucleate or late uninucleate	-Clapham, 1971, Zhou & Yang, 1980
- <i>Oryza sativa</i> spp.	-Mid or late uninucleate	-Guha et al., 1970, Wang et al., 1973
	-Uninucleate or late unicolate	-Ghua-Mukherjee, 1973
- <i>Secale cereal</i>	-Late uninucleate	-Sun, 1978
- <i>Triticale</i>	-Uninucleate	-Sun, et al., 1973
- <i>Triticum aestivum</i>	-Mid- or late uninucleate	-Ouyang, et al., 1973, Pan & Gao, 1978
- <i>T. aestivum</i> x <i>Agropyron glaucum</i>	-Late uninucleate	-Wang et al., 1973

٢- زراعة المتوك Anther culture

نباتات يمكن إكثارها بزراعة المتوك

تتميز طرق الزراعة المعملية للمتوك بأنها بسيطة نسبياً وسريعة ولها كفاءة عالية في إنتاج نباتات أحادية.

وأمكن إنتاج نباتات أحادية بزراعة متوك أو نباتات أحادية أو أنسجة أحادية لنباتات عديدة مثل:

Brassica campestris; *Brassica oleracea*; *Brassica pekinensis*; *Brassica chinensis*;

Lycopersicon spp.; *Lycopersicon esculentum*; *Datura innoxia*; *Datura* spp.;

Luffa echinata; Luffa cylindrica; Capsicum annum; Capsicum frutescens; Citrus limon; Citrus medica; Festuca arundinacea; Festuca pratensis; Nicotiana spp.; Populus spp.; Arachis spp.; Hyoscyamus spp.; Freesia spp.; Glycine max; Asparagus officinalis; Beta vulgaris; Fragraria virginiana; Sorghum vulgare; Saccharum sinensis; Triticum; Triticum aestivum; «T.aestivum x Agropyron glaucum»; Vicia faba; Vitis vinifera; Zea mays. Arabidopsis thaliana; Anemone spp.; Agropyron repens; Atropa bella-donna; Cassia fistula; Coffea arabica; Digitalis purpurea; Gladiolus; Hordeum vulgare; Lilium spp.; Linum usitatissimum; Lotus corniculatus;

فصل وزراعة متوك نبات التبغ

نبات التبغ من الأمثلة النموذجية لإنتاج نباتات أحادية. وتنتخب المتوك غير الناضجة لضمان احتوائها على حبوب لقاح وحيدة النواة Uninucleus وهى فى مرحلة ما قبل الانقسام الميتوزى الأول (Zhou and Yang, 1980). ويمكن إجراء الآتى لإنتاج أجنة ذكورية Androgenesis.

١- تعقم البراعم الزهرية فى محلول هيبوكلوريت صوديوم بتركز ١٪ (وزن/حجم)، أو محلول كلوركس تجارى Clorox بتركيز ٥٪ (حجم/حجم). ثم تغسل البراعم مرتين بماء مقطر معقم مرتين. وإذا فصلت البراعم الزهرية من نباتات نامية داخل صوبة محمية فلا تحتاج إلى تعقيم.

٢- تفصل المتوك بإحداث شق من جانب واحد من البرعم الزهرى. ثم يضغط على الأسدية برفق لفصلها. ثم تفصل المتوك بحذر تام حتى لا يحدث أى ضرر لها، وتستبعد المتوك التى حدث لها ضرر أثناء فصلها لأنها تميل عادة إلى تكوين كالس. ثم تجمع فى طبق بترى معقم وتزرع مباشرة على بيئة غذائية صلبة.

٣- تزرع المتوك بمعدل ٥ - ١٠ متوك فى الدوروف المخروطى مع مراعاة كثافة الزراعة المناسبة.

الاحتياطات اللازمة لفصل وزراعة المتوك

- ١- تعتبر البراعم الزهرية المنقولة بعد تعقيمها سطحيا مصدرا جيدا للمتوك. حيث تزال أوراق الكأس والتويج بحذر، مع الحرص بعدم وصول مواد التعقيم إلى المتوك لتفادى الضرر الذى قد يحدث. وفي نباتات العائلة النجيلية مثل القمح والشعير تعقم السنبلة وهى مازالت متصلة بحامل السنبلة ثم تفصل السنبلة بعد تعقيمها.
- ٢- يفصل المتك تحت ميكروسكوب إذا كان البرعم الزهرى صغيرا مثل نباتات *Asparagus* و *Brassica*. ويتم ذلك بإزالة غلاف الزهرة *Perianth* فقط، والإبقاء على باقى أجزاء البرعم على اتصال مع الأسدية. ولا يؤثر وجود بقايا أجزاء الزهرة فى البيئة الغذائية على طبيعة نمو حبوب اللقاح الموجودة داخل المتوك.
- ٣- فى حالة الأزهار والمتوك كبيرة الحجم تزال الأسدية *Stamens* بأكملها مع الخيط الحامل لها، ثم توضع فى وضع أفقى ويفصل المتك من الخيط *Filament* بدقة وحرص. حيث لا تنتقل المواد الغذائية من البيئة الغذائية إلى المتك خلال الخيط وقد يسبب وجوده منع نمو حبوب اللقاح.
- ٤- تزرع المتوك بعد فصلها مباشرة على بيئة مناسبة صلبة أو سائلة، بحيث يكون هناك اتصال مباشر بينها وبين البيئة الغذائية بما يضمن وصول المواد الغذائية إلى حبوب اللقاح. وزراعة المتوك فى بيئة سائلة يجعلها تطفو على سطحها، لذلك يستلزم تثبيتها على جسر من ورق الترشيح.
- ٥- بالنسبة للأزهار الكبيرة يمكن الحصول على كثافة جيدة من حبوب اللقاح بزراعة متك واحد/ مليلتر بيئة سائلة، حيث تعطى هذه الكثافة حوالى 5×10 حبة لقاح/ مليلتر بيئة فى نبات *Datura innoxia* و 4×10 حبة لقاح/ مليلتر بيئة فى نبات *Nicotiana tabacum*. ويمكن زيادة عدد المتوك/ مليلتر فى البيئة السائلة بالنسبة للبراعم الزهرية الصغيرة للحصول على نفس الكثافة تقريبا.
- ٦- تنبت حبوب اللقاح بعد ٣ - ٤ أسابيع من زراعة المتوك منتج نبيتات أحادية لا تشابه النباتات الثنائية المأخوذة منها. وقد ينتج المتك الواحد أعدادا

كبيرة من النباتات، ويفضل فصلها عن بعضها مباشرة بعد تفتيح المتك. وفصل النبيتات في هذه المرحلة المبكرة يساعد على فصلها ونقلها بسهولة إلى بيئة طازجة جديدة، بينما يؤدي التأخير في فصل النبيتات إلى تداخل وتشابك جذورها داخل المتك المتفتح مما يؤدي إلى تكوين كالس وتكوين أعداد أخرى من الأفرع.

٧- تنقل النباتات ذات المجموع الجذري الجيد إلى عبوات تحتوى على بيت موس ورمل. ويجب إزالة آثار الأجار جيدا من الجذور قبل النقل. ثم تنقل النباتات للصوبة لتبقى تحت الري الرزازى (الضبابى) Mist irrigation لمدة عشرة أيام لإتاحة الفرصة لتكوين مجموع جذرى يقوم بوظيفته جيدا.

البيئة الغذائية المناسبة لزراعة المتوك

تستخدم بنجاح بيئات White, 1963, Murashige and skoog, 1962 Nitsch, 1969, Nitschm وغيرها من البيئات المشتقة منهم فى الزراعة المعملية لمتوك الدخان وقد أدخل عليها بعض التطويرات. ويعتبر الحديد من العناصر الهامة المضافة لبيئة المتوك. وتصنف الأنواع النباتية كالتالى:

١- أنواع نباتية لا تحتاج منظمات نمو

تعتبر بيئة (MS) Murashige and Skooge, 1962 والإضافات التى أحدثها Nitsch, (1967) أساسية لزراعة متوك وحبوب لقاح هذه المجموعة من النباتات. وإضافة الفيتامينات والحديد والسكرورز لهم أهمية فى تحفيز نمو وتكوين النباتات من حبوب اللقاح أو الكالس. ولا تحتاج هذه المجموعة إلى منظمات نمو. وتتميز حبوب اللقاح فيها أنها ثنائية الخلية Bicellular. وتضم هذه المجموعة الأنواع النباتية الآتية:

Datura innoxia ; *Hyoscyamus niger* ; *Petonia hybrida*; *Nicotiana tabacum*;
N. sylvestris ; *N. paniculata* ; *N. knightiana*.

وإضافة الفحم النباتي النشط تحت البيئة الصلبة في وعاء زراعة المتوك يساعد على تكوين كالس جيد وإنتاج أعداد كبيرة من النباتات لقدرته على امتصاص المركبات المثبطة للنمو والمواد الضارة التي يفرزها جدار المتك (Nitsch, 1972, 1974). والتركيز الأمثل للسكروروز هو ٠,٢٦ مولر في بيئة متوك القمح ٠,٣٥ مولر لمتوك الذرة. ويفضل زيادة السكروروز في بيئة متوك النجيليات بوجه عام من ٢-٤٪ إلى ٨-١٢٪، وزيادة السكروروز في بيئة متوك نباتات Barley و Rapeseed و Triticum من ٠,١٨ إلى ٠,٣٥ مولر. (Chen and Li, 1978) ويبين جداول (٢ و ٣) البيئات المناسبة لزراعة حبوب اللقاح ومتوك النجيليات.

٢- أنواع نباتية تحتاج إلى منظمات نمو

تضاف منظمات النمو إلى بيئات متوك وحبوب لقاح هذه المجموعة من النباتات، وتختلف احتياجاتها باختلاف النوع والصف النباتي. وتحتوى هذه الأنواع على حبوب لقاح ثنائية Bicellular أو ثلاثية Tricellular الخلايا، مثل الأنواع التابعة للأجناس *Triticum*; *Oryza*; *Hordeum*; *Tritical*. ويتكون الكالس إذا زرعت متوك هذه النباتات. وقد تفتح أجنة تنمو وتكون نباتات مثل *Brassica campestris* و *Asparagus officinalis*. والأوكسينات هي أهم الهرمونات المؤثرة في طبيعة نمو المتوك، وحاجتها من السيتوكاينين ومنظمات النمو الأخرى أقل كثيرا من حاجتها للأوكسينات. ومن الأكسينات مركبات عديدة أهمها:

3-Indole Acetic Acid (IAA). 3-Indole Butaric Acid (IBA). Naphthalene Acetic Acid (NAA). 2,4,5-Trichlorophenoxy Acetic Acid (2,4,5-T). 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D). 4,4-Chlorophenoxy Acetic Acid (CPA). 4-Amino- 3,5,6-Trichloropicolinic Acid (Pichloram or TCP)

ومن السيتوكاينينات مركبات عديدة أهمها:

6-Benzyl Amino Purine (BAP). 6-Benzyl Adenine (BA). Isopentenyl Adenine (IPA). 6-y-y-Dimethyl ally Amino Purine (2 ip).

5-(4-Hydroxy-3-Methyl-trans-2-Butenylamino) Purine (Zeatin).

6-Furfuryl - Amino Purine (Kinetin = KIN).

والأنواع النباتية التي تحتوى متوكها على حبوب لقاح ثلاثية الخلايا Tricellular تحتاج إلى إضافة سكروز بنسبة ٥ - ١٥٪. بينما الأنواع التي تحتوى متوكها على حبوب لقاح ثنائية الخلايا Bicellular فيضاف السكروز بنسبة ٢ - ٥٪. والسكروز له تأثير منظم للضغط الأسموزى فى البيئة الغذائية. والتركيز العالى للسكروز ضرورى جدا لتحفيز متوك نبات *Brassica campestris* للنمو، حيث يضاف بتركيز ١٠٪ للبيئة + ٠,١ ملليجرام/لتر من كل من NAA 2,4-D. ويضاف السكروز بتركيز ١٢٪ إلى بيئة متوك نبات الشعير *Hordeum vulgare*، و بتركيز ٦ - ٩٪ إلى بيئة الأجناس *Triticum; Tritical; Oryza* مضاف إليه ٢ ملليجرام/لتر 2,4-D، و بتركيز ١٢٪ لمتوك الذرة *Zea mays* مضاف إليه ٢ ملليجرام/لتر من Kinetin و 2,4-D. وتعتبر المكونات الأساسية لبيئة (MS) هى الأفضل للأجناس *Zea* و *Triticum*. و لبيئة Miller (M) قبول واسع فى زراعة متوك الأرز و متوك نباتات أخرى دون غيرها من البيئات. وقد حدثت بعض التغييرات على بيئة Miller (M) مثل زيادة تركيز النترات وتخفيض الأمونيوم، وعرفت هذه البيئة بعد تحديثها بالرمز (MM)، وتستخدم خاصة لزراعة متوك نبات *Brassica campestris* ويضاف مستخلص الخميرة وماء جوز الهند ومستخلص البطاطا والأحماض الأمينية Gluta-mine و Asparagine إلى مكونات البيئة (MM) لزيادة معدل نمو الكالس من حبوب اللقاح وتكشفه إلى أجنة. ويتم إنتاج النباتات من الكالس بإضافة تركيزات مختلفة من الهرمونات، وتخفيض السكروز إلى ٢ - ٣٪. ويتقدم عمر الكالس تنخفض قدرته بشدة على إنتاج نباتات كاملة. كذلك يمكن تغيير نوع وتركيز أملاح العناصر الغذائية فى البيئة. ويفضل قبل نقل النباتات الصغيرة من البيئة الغذائية إلى التربة أن تسبقه الزراعة فى بيئة سائلة ضعيفة تحتوى على أملاح العناصر الغذائية المذكورة فى بيئة White, 1963 + سكر مختزل بتركيز ٠,٥ - ١٪.

تحضين المتوك وحبوب اللقاح

تحصن المتوك وحبوب اللقاح بعد زراعتها عند ٢٤-٢٨٠°م. وارتفاع الحرارة عن ٣٠°م تسبب اختلافا كبيرا فى إنتاج ونمو الكالس وعدد النباتات الناتجة منه. وكان ذلك مؤكدا بالنسبة لنباتات القمح ولقت الزيت. وأن النباتات المعملية الناتجة من متوك القمح المفصولة من سنبلة الفرع الرئيسى كانت أكثر من سنبال الأفرع الجانبية (Hu, et al, 1982). وتعريض متوك القمح والأرز ومحاصيل نجيلية أخرى لحرارة منخفضة ١-٤°م لمدة ٤٨ ساعة قبل زراعتها يؤدي إلى زيادة تكوين الكالس وزيادة الاختلافات (Institute of Genetics, 1977a) (جدول ٦). بينما لا يوجد ما يشير إلى أهمية الضوء فى المرحلة الأولى من زراعة حبوب اللقاح ومتوك التبغ. ويفضل تعريض حبوب اللقاح والمتوك لفترة ظلام قصيرة جدا يتبعها ضوء مستمر لمدة ١٤ ساعة يوميا شدته ٢٠٠٠ لكس لتشجيع نمو النباتات من المتوك وزيادة عددها. بينما جاء فى مضمون بعض الأبحاث على نباتات *Hyoscyamus niger* و *Datura in-* *noxia* أن ١٦ ساعة ضوء فلوروسنت شدته ١٥٠٠ لكس وحرارة ٢٨°م يعقبها ٨ ساعات ظلام وحرارة ٢٠°م أعطت أفضل عدد من النباتات. كما أن زيادة تركيز ثانى أكسيد الكربون والإيثيلين داخل أوانى الزراعة يؤثر تأثيرا ضارا على نمو حبوب اللقاح وتكوين الأجنة. لذلك يضاف للبيئة ايدروكسيد بوتاسيوم لقدرته على امتصاص ثانى أكسيد الكربون ومركب Mercuric perchlo- rate لقدرته على امتصاص الإيثيلين وإضافة ٨-٤٠ ملليجرام/ لتر من 2-Chlo- roethyl-phosphonic acid (مادة منتجة للإيثيلين) للبيئة تؤدي إلى تضاعف استجابة متوك الأرز *Oryza sativa* للنمو. ومضمون ذلك أن حبوب اللقاح والمتوك تختلف باختلاف نوع النبات فى احتياجها من الظروف الهوائية والغازية لتحفيز نمو وتكوين الأجنة وتكثفها.

جدول (٦) درجات الحرارة والمدة المناسبة لإنبات متوك بعض النجيليات

Species	(°C)	Duration
Hordeum vulgare	3	48 h.
Oryza sativa	10	48 h. or 4 - 7 days
Secale cereal	6	3- 15 days
Triticale	3- 5	72 hr.
Triticum aestivum	3- 5	48 hr.

منشأ الأجنة الأحادية Haploid embryogenesis

١- أجنة ذكورية المنشأ والتكوين Androgenesis

هي أجنة أحادية العدد الكروموسومي تنشأ في العمل من حبوب لقاح (جاميطات ذكورية) Microspores أو متوك بعد زراعتها في العمل. وينتج عنها نباتات أحادية. وتختلف هذه النباتات وراثيا وظاهريا عن نبات الأم الذي فصل منه حبوب اللقاح والمتوك. وتنشأ الأجنة الأحادية بإحدى طريقتين:

(أ) منشأ أجنة ذكورية من حبوب اللقاح Pollen embryogenesis

- تكوين مباشر للأجنة الذكورية Direct embryogenesis حيث تنتج أجنة أحادية العدد الكروموسومي مباشرة من حبوب اللقاح بدون الدخول في مرحلة تكوين الكالس. وبعد ٣- ٤ أسابيع تظهر الأجنة في صورة نموات أنبوبية تنمو وتتطور إلى نباتات أحادية العدد الكروموسومي.

- منشأ غير مباشر للأجنة Indirect embryogenesis حيث يتكون كالس أحادي العدد الكروموسومي من حبوب اللقاح. ثم يتكشف الكالس إلى أجنة أحادية ينتج عنه نباتات أحادية.

(ب) منشأ أجنة ذكرية من المتوك Anther embryogenesis

حيث ينتج عن زراعة المتوك نباتات مختلفة المستوى فى التضاعف الكروموسومى. فالنباتات الناتجة من حبوب اللقاح تكون أحادية العدد الكروموسومى، والنباتات الناتجة من خلايا جدار المتك والخلايا الضامة تكون ثنائية العدد الكروموسومى لأنها خلايا جسمية. وتختلف الفترة اللازمة لخروج النباتات من المتك باختلاف الأنواع النباتية. فتحتاج متوك الدخان من ٣ إلى ٥ أسابيع، وتحتاج متوك نبات الأتروبا والأرز إلى ٨ أسابيع. والمتوك المحتوية على حبوب لقاح وحيدة النواة Uninucleus والمزروعة على بيئة (MS) يتحول لونها إلى اللون البنى خلال أسبوعين بدون ظهور أى نمو. وبعد أسبوعين آخرين تظهر نموات أنبوبية هى عبارة عن أجنة مصدرها حبوب اللقاح فى المتك، حيث تتطور بعد ذلك لتصبح نباتات أحادية العدد الكروموسومى Pollen embryogenesis. وقد يظهر عند الطرف القاعدى للمتك خلايا كالس تنمو حتى تغطى كل المتك وقد تنتج نباتات من الكالس ثنائية العدد الكروموسومى لأن مصدرها خلايا جسمية. وبعد ٦ أسابيع تقريبا يمكن نقل النباتات إلى التربة.

٢- أجنة أنثوية المنشأ والتكوين Genogenesis

هى أجنة أحادية العدد الكروموسومى تنشأ من بيضة غير مخصبة، وينتج عنها نباتات أحادية مختلفة وراثيا ومظهريا عن النبات الأم المفصول منه البيضة. وتنشأ هذه الأجنة الأحادية بإحدى طريقتين:

- نشوء الأجنة البكرية Parthenogenesis

قد تتكون نباتات أحادية تلقائيا بنسبة لا تزيد عن ٠,١٪ بدون تدخل الإنسان. وهى من الحالات النادرة التى تحدث فى بعض النباتات دون غيرها. ومصدر إنتاج الأجنة البكرية هو المبيض. فقد ينشط المبيض وينمو مكونا ثمرة تحتوى على بذور بدون اخصاب. وهذه البذور أحادية العدد الكروموسومى، وبزراعة هذه البذور فى

المعمل تنتج نباتات أحادية ضعيفة النمو صغيرة الحجم عقيمة وغير قادرة على الانقسام الاختزالي وتكوين خلايا تناسلية، لأنها تحتوى على كروموسومات غير متشابهة ولا تستطيع أن تكون أزواجا كروموسومية Bivalents، وهذه من خصائص المجموعة الكروموسومية الأحادية. وتتكون الأجنة الأحادية ذاتيا في الطبيعة من خلال التكوين البكرى، أى بدون إخصاب، نتيجة لزيادة محتواها من هرمونات النمو وقد يحدث التلقيح وتنبت الأنبوبة اللقاحية من حبة اللقاح ولكنها تكون غير قادرة على استكمال نموها والنفاذ إلى المبيض وإتمام الإخصاب. ويكون دور حبوب اللقاح فى هذه الحالة هو تنبيه المبيض فقط لإفراز هرمونات النمو.

- نشوء الأجنة من البيضة

هى أجنة تنشأ من البيضة غير المخصبة (الجاميطة المؤنثة) بعد فصلها وزراعتها فى المعمل. وهى أجنة أحادية العدد الكروموسومى ينتج عنها نباتات أحادية لها نفس مواصفات الأجنة البكرية.

بعض الممارسات الوراثية لإنتاج أجنة أحادية

١- طريقة إقصاء الكروموسومات Chromosomes elimination

تستخدم هذه الطريقة لإنتاج أجنة شعير أحادية العدد الكروموسومى Haploid بكفاءة عالية. وتعتمد هذه الطريقة على إدخال نوع الشعير *Hordeum bulbosum* فى تهجين مع النوع *Hordeum vulgare* لإنتاج هجين "*H. bulbosum x Hordeum vulgare*". فتنمو أجنة الهجين لمدة ١٠ - ١٤ يوما من الإخصاب ثم تموت بعد اختفاء كروموسومات النوع *H. bulbosum*. فإذا فصلت أجنة الهجين مبكرا بعد ١٠ أيام من الإخصاب قبل موتها ثم زرعت على بيئة (B5) خالية من الأكسين 2,4-D فإنها تستمر فى النمو وتكون نباتات معظمها أحادية العدد الكروموسومى ($n=7$)

Monoploid، تحتوى على كروموسومات النوع *Hordeum vulgare* فقط. وبمعاملة النباتات بالكولشسين تنتج نباتات ثنائية متجانسة من النوع *H. vulgare*. وتحتوى الخلية الجسمية للشعير ثنائية العدد الكروموسومى Diploid على ١٤ كروموسوما ($2n = 14$). والجاميطة المذكرة والمؤنثة هى خلايا أحادية Haploid تحتوى على نصف عدد الكروموسومات ($n = 7$). وباندماج الجاميطتين عن طريق التلقيح والإخصاب ينتج الهجين «*H. bulbosum* x *H. vulgare*» الذى تحتوى أجنته على ١٤ كروموسوما، أى أجنة ثنائية العدد الكروموسومى ($2n = 14$) وخاصة إقصاء Elimination كروموسومات النوع *H. bulbosum* بعد التهجين هى صفة وراثية بصرف النظر عن استخدامه كأب أو أم فى التهجين أو إذا كان ثنائيا Diploid أو رباعيا Tetraploid.

كذلك تم الحصول على نباتات قمح أحادى بتهجين قمح سداسى *Triticum aestivum* ($2n = 6X = 42$) مع شعير ثنائى (*H. bulbosum* ($2n = 2X = 14$)). وقد حدث إقصاء (تخلص ذاتى) لكروموسومات النوع *H. bulbosum* وتكونت أجنة أحادية من القمح *T. aestivum* ($n = 3X = 21$). وقد تميزت هذه الطريقة عن طريقة زراعة المتوك فى إنتاج نباتات أحادية العدد الكروموسومى من أى صنف تجارى من الشعير. ومعدل إنتاج النباتات الأحادية مرتفع جدا. كذلك يمكن الاستفادة من هذه الطريقة فى إنتاج نباتات أحادية متضاعفة Dihaploids من نباتات البطاطس *Solanum tuberosum* الرباعية Tetraploids بواسطة تهجين النوع *S. phureja* الثنائى. بحبوب لقاح من النوع *S. phureja* الثنائى.

٢- زراعة الإندوسبرم Endosperm culture

تم الحصول على كالس وأجنة ونباتات ثلاثية التضاعف الكروموسومى Triploids بزراعة نواة الإندوسبرم المفصلة من الكيس الجنينى للموالح ($3n = 27$) بعد حوالى شهرين من الإخصاب. وقد تحقق ذلك بزراعة الإندوسبرم المفصول من الموالح *Citrus grandis* L. Osbeck صنف Bei Pei Pummels والنوع *C. sinensis* Osbeck صنف Chin- Cheng or- ange على بيئة غذائية (2 MT) مضافا إليها (GA3) بتركيز ٥,٧٧ - ٤٣,٣ ميكرومولر.

العوامل المؤثرة فى تكوين الأجنة الذكرية

Androgenesis

تنتج أجنة ذكرية فى المعمل بزراعة متوك بعض الأنواع النباتية التابعة للعائلة الباذنجانية Solanaceae والنجيلية Gramineae والصليبية Cruciferae. والعوامل المؤثرة فى إنتاج الأجنة الذكرية منها:

١- عمر النبات

يؤثر عمر النبات والمرحلة الفسيولوجية تأثيرا واضحا على تكوين الأجنة الذكرية. فالأزهار المفصولة من نباتات حديثة العمر نسبيا وفى بداية موسم التزهير تكون مناسبة لإنتاج أجنة ذكرية أكثر من البراعم الزهرية المفصولة من نباتات متقدمة فى العمر أو فى نهاية موسم التزهير.

٢- مرحلة نمو حبوب اللقاح

مرحلة نمو حبوب اللقاح من العوامل الهامة المؤثرة فى إنتاج أجنة ذكرية. فزراعة متوك التبغ والذاتورا والهيوسيامس *Hyoscyamus* وهى فى مرحلة تكون فيها حبوب اللقاح أحادية النواة Uninucleate تنتج نباتات أحادية العدد الكروموسومى فقط. بينما زراعة حبوب لقاح متقدمة فى العمر تعطى نباتات متعددة فى مستوى التضاعف الكروموسومى، وكانت أفضل النتائج بالنسبة لنباتات التبغ والطماطم عندما كانت حبوب اللقاح فى مرحلة ثنائى النواة Binucleate.

٣- الصدمات الحرارية Thermal shocks

الصدمات الحرارية المرتفعة أو المنخفضة أو المتبادلة مع بعضهما تظهر نجاحا فى تكوين الأجنة الأحادية فى مزارع المتوك وحبوب اللقاح، وقد تحقق ذلك فى نباتات

الداتورا، والطماطم والأتروبا والتبغ. والمعاملة الباردة التي يعقبها فترة قصيرة حرارة مرتفعة تؤدي إلى انقسام متكرر لحبة اللقاح. وتعرض متوك نبات الكرنب *Brassica* لحرارة ٣٠°م لمدة ٢٤ ساعة أو ٤٠°م لمدة ساعة واحدة كان له تأثير منشط لتكوين الأجنة الذكرية (Keller, et al. 1981). وقد فسر ذلك بأن المعاملة الباردة لها تأثير غير مباشر في زيادة عدد الأجنة الذكرية، والحرارة المنخفضة ٣-٥°م تحافظ على حيوية حبوب اللقاح مدة طويلة وتؤخر شيخوختها وتمنع اجهاضها. ويزداد بذلك عدد حبوب اللقاح القادرة على تكوين أجنة ذكرية (Bajaj 1978a). بينما الصدمات الحرارية تؤدي إلى تحلل الأنابيب الدقيقة Microtubules وتشتت خيوط المغزل من مكانها وتسبب انقسامات شاذة لنواة حبة اللقاح.

٤- الفحم النباتي Active charcoal

إضافة الفحم النباتي بنسبة ٢٪ إلى البيئة المزروعة بمتوك نبات التبغ يؤدي إلى زيادة عدد الأجنة الذكرية من ١٥٪ إلى ٤٥٪ للصف هافانا Havana، ومن ٤١٪ إلى ٩١٪ للصف Badischer Burley. ويؤدي إلى زيادة عدد النباتات وسرعة نموها، ويؤدي أيضا إلى زيادة عدد الأجنة الذكرية للأنيمون Anemone والشوفان Rye والبطاطس. وينشط تكوين الأجنة الذكرية لنبات الجزر في حالة غياب الأكسجين من البيئة. وإضافة الأكسجين للبيئة ينشط تكوين الأجنة الذكرية لنبات التبغ في حالة غياب الفحم النباتي. وترجع أهمية الفحم النباتي في تنشيط وإنتاج الأجنة الذكرية لبعض الأنواع النباتية إلى قدرته على امتصاص مركب 5-Hydroxymethyl furfural الناتج من السكرز أثناء تعقيم البيئة بالأوتوكلاف وغيره من المركبات السامة التي تسبب موت الأجنة الذكرية النامية من حبوب اللقاح. كما أن الفحم النباتي يقوم بتنظيم امتصاص منظمات النمو الداخلية En-dogenous والخارجية Exogenous.

طرق الحصول على أجنة أحادية من البيضة

١- زراعة بويضات غير مخصبة فى المعمل

هى وسيلة لإنتاج نباتات أحادية تحمل صفات الأم. ويتم ذلك بزراعة البيضة غير المخصبة. وقد أمكن إنتاج نباتات أحادية من نبات *Aerva tomentosa* بزراعة البراعم الزهرية أو السنابل غير المخصبة.

٢- تنبيه المبيض باستخدام حبوب لقاح غير مكتملة الحيوية

ينشط المبيض باستخدام حبوب لقاح غير كاملة الحيوية أو من أنواع بعيدة القرابة. وتعرض حبوب اللقاح لجرعات مناسبة من أشعة جاما أو الأشعة السينية يؤدى إلى خفض حيويتها بحيث يكون لها القدرة على الإنبات واختراق الميسم والقلم لمسافة محدودة ثم تموت قبل الوصول إلى الكيس الجنينى ، وهذه المعاملة تعمل على تنبيه المبيض للنمو وتكوين أجنة أحادية تحمل نصف عدد كروموسومات الأم. فإذا زرعت الأجنة مبكرا فى المعمل تنتج نباتات أحادية عقيمة لا تنتج بذورا إلا إذا تحولت إلى نباتات ثنائية بالكولشين.

٢- تنبيه البيضة بالصدمة الحرارية Thermal shocks

قد تؤدى المعاملة الحرارية المفاجئة إلى تنبيه المبيض للنمو وتكوين أجنة بكرية بدون إخصاب. وبزراعة هذه الأجنة تنتج نباتات أحادية. وقد تحقق ذلك بتعرض نباتات الداتورا *Datura stramonium* إلى حرارة منخفضة أثناء الإخصاب، وتعرض نباتات التبغ إلى حرارة منخفضة أو مرتفعة، وتعرض نباتات الشوفان Rye إلى ٣°م. وفى جميع هذه الحالات تكون النباتات الناتجة فى المعمل أحادية عقيمة ناتجة أصلا من البيضة وتحتوى على كروموسومات البيضة فقط. ولإنجاح هذه التجربة يجب تعرض كل من البيضة وحب اللقاح إلى نفس الصدمة الحرارية. وتسبب الصدمات الحرارية

المفاجئة إلى تغيير نظام انقسام نواة حبة اللقاح والبيضة. فقد وجد أن معاملة حبوب لقاح نبات *Hyoscyamus orientalis* بالبرودة فقط تفقدها القدرة على الإخصاب.

٤- تنبيه البيضة بالمعاملة الكيميائية Chemical treatment

تحدث بعض الكيماويات ظاهرة الأجنة البكرية Parthenogenesis، فلو حظ نشاط البيضة داخل الكيس الجنيني وانقسامها عدة انقسامات متتالية بعد حقن مبيض نبات البيتونيا بمركب بلفيتان Belvitan، أو رش النباتات ببعض منظمات النمو مثل الإيثريل Ethrel التى تسبب عقما ذكوريا ويبقى المبيض حيا ليكون ثمرة.

الإخصاب المعملی In vitro fertilization

يواجه مربو النبات بعض الظواهر مثل عدم التوافق الذاتى Self-incompatibility وعدم التوافق الخلطى Cross-incompatibility. ويعنى ذلك عدم إنبات حبة اللقاح على الميسم وعدم حدوث إخصاب، وقد تنبت حبة اللقاح وتخرج منها أنبوبة لقاحية ولكنها لا تستطيع استكمال مسارها داخل القلم وتتوقف قبل الوصول إلى المبيض ولا يكتمل الإخصاب. وقد يحدث إخصاب لخلية البيضة ويتكون الجنين ولكنه يتوقف عن النمو ويموت مبكرا. ومضمون ذلك أن عدم التوافق يؤدي إلى عدم تكوين البذور. ولم تظهر فكرة الإخصاب المعملی داخل أنبوبة اختبار قبل ١٩٦٢. وفى الواقع أن المعلومات حول الإخصاب المعملی مازالت محدودة.

طرق الإخصاب المعملی

١- إخصاب الميسم Stigma fertilization

فى هذه الطريقة تعقم الزهرة الخنثى تعقيما جيدا، مع الحرص بعدم ملامسة الميسم لمادة التعقيم لفترة طويلة حتى لا يؤدي إلى إزالة المادة اللزجة وعدم التصاق

حبوب اللقاح على الميسم. ويمزغ المبيض المعقم على بيئة غذائية صلبة فى أنبوبة اختبار، ثم تنثر حبوب اللقاح من المتك على الميسم. وهذه الطريقة معادلة للإخصاب الذى يتم فى الحقل. ويمكن استخدامها إذا كان المبيض يسقط مبكرا قبل النضج. ويعتبر إخصاب الميسم أفضل من إخصاب المشيمة لنبات التبغ وتستخدم هذه الطريقة بنجاح مع الأنواع:

Antirrhinum majus; Pisum sativum; Lathyrus odoratus; Zea mays; Glycine max; Nicotiana rustica; Nicotiana tabacum; Petunia violacea.

٢- إخصاب المشيمة Placental fertilization

تفصل مشيمة محتوية على بويضات غير مخصبة من زهرة معقمة جيدا. ويتم ذلك تحت ستريوميكروسكوب ثم تزرع فى بيئة غذائية. وتعم المتوك وهى فى مرحلة ما قبل الانفتاح مباشرة. وتستخدم المتوك التى تنفتح أثناء التعقيم، وينثر منها حبوب اللقاح قريبا من البويضات غير المخصبة. وينتظر حتى تنبت حبوب اللقاح وتخرق الكيس الجنينى Embryo-sac. وقد نجحت هذه الطريقة مع نباتات العائلة *Caryo-phyllaceae* والأنواع النباتية التابعة لجنس القطن *Gossypium* والذرة *Zea mays*.

عوامل إنجاح الإخصاب المعملی

- أن تكون حبوب اللقاح والبويضات فى حالة فيسيولوجية وتكوينية سليمة.
- يجب أن تتغير مكونات البيئة الغذائية بتغيير مرحلة النمو ابتداء من إنبات حبوب اللقاح والإخصاب ونمو الجنين، وقد يضاف إليها بعض المعقدات الطبيعية المناسبة لكل مرحلة.
- درجة حرارة التحضين قد تكون عاملا هاما لإنجاح عملية الإخصاب، فمثلا يحتاج البنفسج *Nareissus* إلى التحضين عند أقل من ٢٥°م ويحتاج الخشخاش *Papaver somniferum* للتحضين عند أكثر من ٢٥°م.
- ينجح إخصاب المشيمة أحيانا إذا كانت النباتات تحتوى بصورة طبيعية

على ظاهرة عدم التوافق الذاتي. ومن أمثلة ذلك التهجين بين نباتات نوعين من البيتونيا: *Petunia hybrids* و *Petunia axillaris*.

– ينجح التلقيح الخلطي أحيانا حتى ولو كان غير ناجح فى الحقل. وقد تم إنتاج نباتات هجن من نبات التبغ نوع *Nicotiana glauca* بعد إخصاب البويضات فى أنبوبة اختبار بحبوب لقاح من نبات التبغ نوع *Nicotiana glauca*.

طرق مضاعفة العدد الكروموسومى

١- تضاعف العدد الكروموسومى بدون انقسام النواة Endomitosis

الخلايا الأحادية Haploids هى خلايا غير مستقرة أثناء الزراعة المعملية، وتميل دائما إلى مضاعفة العدد الكروموسومى ذاتيا بدون انقسام للنواة، فيتضاعف عدد الكروموسومات داخل النواة وتصبح خلية ثنائية.

٢- المعاملة بالكولشيسين Cholchicine treatment

يستخدم الكولشيسين على نطاق واسع كمانع لتكوين خيوط المغزل Spindle والصفحة الوسطى Middle lamella بالخلية، فيتضاعف عدد الكروموسومات بها وتصبح خلية واحدة متضاعفة ينتج عنها نبات متضاعف Polyploid. وقد تم الاستفادة من هذا المركب للحصول على سلالات ثنائية متجانسة Homozygous lines من خلال الزراعة المعملية لخلايا أو أنسجة أحادية العدد الكروموسومى. ويتم ذلك بزراعة المتوك ومعاملة النباتات الأحادية الناتجة. وهى مازالت متزاحمة ومحاطة بجدار المتك - بمادة الكولشيسين بتركيز ٠,٥٪ ولمدة ٢٤ - ٤٨ ساعة ثم تغسل جيدا بعد إخراجها من المتك ثم يعاد زراعتها معمليا بعد فصلها عن بعضها. كذلك يمكن معاملة النباتات الناضجة بعجينة من اللانولين Lanolin تحتوى على ٠,٤٪ كولشيسين وتضاف إلى إبط الأوراق. وعند الحصول على نباتات ثنائية خصبة متجانسة يمكن استخدامها كسلالات نقية Inbred lines تدخل بعد ذلك فى إنتاج الهجن.



الباب الثامن

زراعة البروتوبلاست Protoplast fusion

حتى عام ١٩٧٠ كانت الممارسات الوراثية فى النباتات مركزة على نقل عوامل وراثية من نبات إلى آخر باستخدام التلقيح والإخصاب وإنتاج بيضة مخصبة Zygote. ويحتوى الزيغوت على كروموسومات نصفها من الأب والنصف الآخر من الأم. والكروموسومات هى الحاملة للجينات المعبرة عن الصفات الوراثية للنبات وتسمى جينات كروموسومية Chromosomal genes ومقرها النواة. ويحمل الكلوروبلاست والميتاكوندريا جينات خاصة بصفات السيتوبلازم وتسمى جينات سيتوبلازمية Cyto-plasmic genes موروثة من الأم. ويمكن نقل المادة الوراثية بدمج بروتوبلاست خليتين مهضوم جدارهما بواسطة الإنزيمات. وبعد هضم الجدار الخلوى يكون البروتوبلاست مغلفا بالبلازماليمما Plasmalemma. ثم يخرج البروتوبلاست تاركا البلازماليمما. وقد يكون البروتوبلاست المندمج خاصا بخليتين من الخلايا الجسمية (ثنائية Diploid) أو خاصا بخليتين من الخلايا الجنسية (أحادية Haploid) مثل بروتوبلاست حبوب اللقاح. ويعتبر دمج البروتوبلاست من طرق الوراثة الجزيئية Molecular genetic التى تهدف إلى نقل مادة وراثية بعيدا عن استخدام التكاثر الجنىسى.

النباتات التى يمكن إكثارها بالبروتوبلاست

يمكن فصل البروتوبلاست من جميع الأنواع النباتية تقريبا، ولكن لايمكن إكثارها جميعا بالبروتوبلاست. فيمكن إكثار أنواع نباتية كثيرة مثل التبغ والطماطم والبطاطس والفلفل والباذنجان التابعة للعائلة الباذنجانية Solanaceae وبعض الأنواع التابعة للجنس Brassica التابع للعائلة الصليبية Cruciferae وبعض محاصيل العلف For-age التابعة للعائلة البقولية Leguminasae وبعض الأنواع التابعة للعائلة الخيمية Umbelliferae. أما عن العائلة النجيلية Gramincae فيصعب تكاثرها بالبروتوبلاست

باستثناء الأرز الذى يمكن اكثاره بالبروتوبلاست. وأثبتت بعض التجارب الفردية عدم نجاح تكاثر القمح وقصب السكر والذرة والشعير والراى Rye والتريتیکال Triticum والسورجم Sorghum بالبروتوبلاست. بينما توجد بشائر ناجحة فى إكثار بعض نباتات الأعلاف البقولية مثل البرسيم الحجازى Alfalfa والبرسيم المصرى Clovers والتريفوال Trefoils والنباتات البقولية المنتجة للحبوب مثل فول الصويا والبسلة والفاصوليا والترمس. وبالرغم من ذلك فإنها تحتاج إلى مزيد من الأبحاث المؤكدة مع الاهتمام بخصوصية النباتات الناتجة.

مراحل إنتاج البروتوبلاست المندمج (الهجين)

- ١- مرحلة اختيار الجزء النباتى.
- ٢- مرحلة اختيار الإنزيمات الهاضمة لجدر الخلية.
- ٣- مرحلة زراعة الخلايا النباتية.
- ٤- مرحلة فصل البروتوبلاست.
- ٥- مرحلة تنقية البروتوبلاست.
- ٦- مرحلة اندماج البروتوبلاست.
- ٧- مرحلة عزل البروتوبلاست المندمج.
- ٨- مرحلة الانتخاب المعطى للطفرات.
- ٩- مرحلة تكوين جدر جديدة لخلايا البروتوبلاست.
- ١٠- مرحلة انقسام ونمو خلايا البروتوبلاست.

١- مرحلة اختيار الجزء النباتى

تختلف الأنواع النباتية فى استجابتها للتكاثر بالبروتوبلاست، لذلك فإن اختيار النوع النباتى المناسب له أهمية كبيرة فى انجاح التجربة. وأن يكون البروتوبلاست المندمج ثابتاً وراثياً. وأن تفصل الأجزاء النباتية من نباتات جيدة النمو وخالية من

الأمراض ونامية فى المعدل أو صوبة محمية. فإذا فصلت الأجزاء النباتية من نباتات نامية خارج المعدل فيستلزم تعقيمها جيدا حتى لا يؤثر رداءة التعقيم على جودة البروتوبلاست.

وفصل البروتوبلاست من أنسجة نباتية عديدة بصرف النظر عن مرحلة نموها مثل القمم النامية للأفرع والبادرات والفلقات والسويقة الجنينية Hypocotyl والأنسجة الخازنة للدرنات والكورمات والفلقات وغيرها.

وتفصل الأوراق الخضراء حديثة العمر المغطاة بطبقة رقيقة من الكيوتيكول لسهولة هضم الجدر الخلوية بالإنزيمات وتحقيق أعلى عائد من البروتوبلاست. بينما أنسجة الأوراق البالغة تكون ملجننة ويصعب هضمها بالإنزيمات وتعطى عائدا أقل من البروتوبلاست. وتعتبر خلايا الميزوفيل Mesophyll فى الورقة من المصادر الهامة للبروتوبلاست لقدرتها على التمثيل الضوئى. وتعتبر مزارع الخلايا المعلقة مصدرا هاما للحصول على البروتوبلاست لأنها خلايا نشطة فى الانقسام، ولها قدرة عالية للتطور وتكوين جدر خلوية جديدة. وعند فصل البروتوبلاست من الخلايا المعلقة يجب اختيار الخلايا التى تكون فى مرحلة نمو واضحة وتكون ذات جدر رقيقة غير مغلظة. ولا يفضل أحيانا استخدام الكالس أو الخلايا المعلقة لعدم ثباتها وراثيا، مع أن التغييرات الوراثية لها أهمية كبيرة عند مربى النباتات واستحداث الطفرات.

٢- مرحلة اختيار الإنزيمات الهاضمة لجدر الخلية

يفصل البروتوبلاست باستخدام مجموعة من الإنزيمات الهاضمة للجدر الخلوية. ويمكن التعرف من الدراسات السابقة على الإنزيمات المناسبة لهضم جدر الخلايا لكل نوع من النباتات وتحديد التركيز المناسب لكل إنزيم ومدة المعاملة، وقد يستلزم إجراء تجارب للحصول على هذه المعلومات. ويجب التعرف إلى مكونات الجدار الأولى للخلية، حيث تختلف مكوناته باختلاف نوع الخلية ومصدرها إن كانت من نباتات ذات فلقيتين أو ذات فلكة واحدة. ويتركب الجدار الأولى

فى جميع النباتات أساسا من مواد غروية محبة للماء شاملة البروتين والسليلوز والهيميسليلوز. وفى خلايا نباتات الفلقتين يكون السليلوز والألياف مغطى بطبقة واحدة من الهيميسليلوز Hemicellulose مرتبطا بالزيلوجلوكان Xyloglu-can. ويرتبط الهيميسليلوز والألياف بمواد بكتينية مرتبطة بالزيلوجلوكان. بينما فى خلايا نباتات الفلقة الواحدة يكون الهيميسليلوز مرتبطا بأرابينوزيلان-Arabi-noxylan. وعلى ذلك يتطلب استخدام خليط من الإنزيمات يتكون من محلول مركز من Cellulase لتفكيك وتحليل الجدار الأولى للخلية و Pectinase لفصل الخلايا من الطبقة الوسطى للأوراق النباتية. وتأثير هذين الإنزيمين فى صورتها الطبيعية أقوى من الإنزيمات الصناعية. وهذا يدل على احتواء الإنزيم الطبيعى الخام على مركبات وإنزيمات أخرى لها أهميتها فى تحليل الجدار الأولى. ويستخلص السليلوليز من فطر *Myrothecium verrucaria* وحشرة *Trichoderma viride*. ويستخلص البكتينيز *Pectinase* من فطر *Rhizopus*. ويستخلص معقد إنزيمى من فطر *Basidiomycete* له القدرة على إذابة الجدار الخلوى لبعض الأنواع النباتية بفاعلية كبيرة. ويقوم إنزيم الهيميسليلوليز بإذابة الجدار الخلوى بنجاح. ويستخلص خليط من الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية من الطحالب. ويستخدم عادة خليط من السليلوليز لإذابة السليلوز Cellulose والبكتينيز لإذابة البكتين Pectine والهيميسليلوليز لإذابة الهيميسليلوز. وتحقق بعض الإنزيمات الصناعية نجاحا فى ذلك. وبالرغم من ذلك يتميز العديد من الخلايا بأن لها جدرا ثانوية مقاومة لفعل هذه الإنزيمات ويصعب تحليلها إنزيميا ويصعب فصل البروتوبلاست منها. وقد يكون لمعقد الإنزيمات الخام تأثيرات غير مرغوبة على البروتوبلاست المستخلص بفعل الآثار الجانبية للمواد الأخرى الداخلة فى تركيبه. فقد تسبب هذه الإنزيمات انفجار الخلايا المنتفخة Turgid وخروج البروتوبلاست بسرعة كبيرة مما يؤدى إلى موتها ، خصوصا إذا تعرضت الخلايا المنتفخة للإصابة بمرض العفن الطرى Soft rot. أما إذا كانت الخلايا متبلزمة فإن البروتوبلاست يبدى مقاومة أكبر لهذه الإنزيمات وتكون سرعة خروجه أقل. لذلك يفضل تعريض الأنسجة النباتية المصابة بالأمراض إلى حالة

البلزمة قبل تعريضها للإنزيمات لتقليل الضرر المتوقع على البروتوبلاست. ويجب التخلص من الأملاح الموجودة طبيعياً في مستخلص الإنزيمات، وذلك بوضعه في عمود Biogel P6 Column مقاسه $40 \times 2,5$ سم ثم يقسّل العمود بإضافة ٥ مليلتر من الماء حتى تفصل الأملاح تدريجياً من المستخلص. ثم تجمع الجزيئات المتبقية مع بعضها وتجفف بالتجميد Freeze dry، وتضاعف هذه الطريقة فاعلية الإنزيم في فصل البروتوبلاست بسرعة. وقد ثبت نجاح هذه الإنزيمات في فصل البروتوبلاست من الخلايا المعلقة.

٢- مرحلة زراعة الخلايا النباتية

يفضل زراعة الخلايا في بيئة سائلة لاستخلاص البروتوبلاست منها وإمكان التحكم في مكونات البيئة الغذائية والبيئة المحيطة أثناء التحضين. كما تساعد البيئة السائلة على ترشيد استهلاك الإنزيمات الهاضمة وتوفير قدر كبير منها وتساعد على تفكك الأنسجة وزيادة عدد الخلايا المنفردة في البيئة بسبب انتشار الإنزيمات بين الخلايا وإذابة الجدر الخلوية وتحرير البروتوبلاست منها بسهولة. والبروتوبلاست الناتج من البيئة السائلة يتأقلم بسرعة للزراعة العملية ولا يحتاج إلى تعقيم. وقد تتعرض الخلايا للبلزمة أثناء فصل البروتوبلاست وتحدث لها أضرار شديدة. لذلك توضع الخلايا المفككة في محلول منظم للضغط الأسموزي، ثم يضاف المحلول المنظم المحتوي على الخلايا إلى محلول الإنزيمات لضمان استقرار البروتوبلاست وعدم انفجاره. ويجب تحديد التركيز المناسب من المحلول المنظم ومتابعة أثره على سلامة البروتوبلاست أثناء خروجه من الخلية والحصول على أكبر كمية منه. ويستخدم الجلوكوز والسكروز والمانيتول والسوربيتول كمركبات لضبط الأسموزية عند $700 - 800$ ملليموز. وتسبب المعاملة الخطأ انخفاض حيوية البروتوبلاست.

٤- مرحلة فصل البروتوبلاست

خطوات فصل البروتوبلاست

١- تزرع الأجزاء النباتية المعقمة في دوارق سعة ٢٥٠ مليلتر تحتوى كل منها على ٩٠ مليلتر بيئة سائلة للحصول على كالس. وتجدد زراعة الكالس في بيئة سائلة طازجة ثلاثة مرات، بين كل فترة وأخرى ٤ أيام، للحصول على كمية كبيرة من البروتوبلاست. والتأخير في استخلاص البروتوبلاست يقلل كميته.

٢- تثبت الدوارق على جهاز هزاز يعمل بسرعة ١٢٤ دورة/ دقيقة لمدة ١٠-١٤ يوما، بعدها تقسم البيئة بكل دورق على ثلاثة دوارق جديدة بمعدل ٣٠ مللى/ دورق. ويضاف بيئة سائلة طازجة ليصل حجمها ٩٠ مللى/ دورق. ثم ترفع الدوارق من الهزاز وتترك لترسب الخلايا إلى القاع. ويتم التخلص من الجزء العلوى من البيئة السائلة. ثم ينقل الجزء السفلى المحتوى على الخلايا المترسبة إلى دورق آخر سعة ١٠٠ مليلتر.

٣- يضاف إلى معلق الخلايا خليط من إنزيمات معقمة بواسطة مرشحات تعقيم. ويحتوى الخليط على ٣٪ Driselase + ٠,٠٥٪ Pectic Acid Transe Lim- (PATL) + inase ١٣٪ مانيتول + أملاح CPW. وتضبط الحموضة عند pH 5.6. ويضاف خليط الإنزيمات بمعدل ٢٠ مليلتر/ دورق. ويفضل أن تتم المعاملة الإنزيمية بسرعة. ثم تحضن عادة فى ظلام عند ٢٧°م بعد تثبيت الدوارق على هزاز يعمل بسرعة ٧٢ دورة/ دقيقة لمدة ٢-٢,٥ ساعة.

٤- يضاف إلى خليط الإنزيمات ٢٥ مليلتر من محلول يحتوى على ١٣٪ مانيتول وأملاح CPW.

٥- ينقل المحلول المحتوى على خلايا وبروتوبلاست إلى أنابيب اختبار تحتوى على غطاء محكم الغلق وتثبت على جهاز طرد مركزى يعمل بسرعة ١٠٠ دورة/ دقيقة ولمدة ٥ دقائق، ثم يستبعد الجزء العلوى من البيئة الغذائية ويضاف بدلا منه حجم صغير من محلول يحتوى على ١٣٪ مانيتول + أملاح CPW.

٦- يمرر المحلول بأكمله خلال منخل من النايلون الخشن للتخلص من البقايا الكبيرة من حطام الخلايا، ثم يمرر مرة ثانية خلال منخل نايلون ناعم (٠,٦٤ ميكرومتر) للتخلص من البقايا الأصغر حجماً. ثم يحمل الراشح المحتوى على خلايا وبروتوبلاست على جهاز طرد مركزي يعمل بسرعة ١٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٥ دقائق، ثم يستبعد الجزء الطافي.

٧- يضاف إلى الخلايا والبروتوبلاست محلول يتكون من ٢١٪ سكروز + أملاح CPW ويعاد تحميل الدوارق على جهاز طرد مركزي يعمل بسرعة ١٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٥ دقائق لتجميع البروتوبلاست في الجزء العلوي من السائل بينما تهبط الخلايا وحطامها إلى القاع. ويسحب البروتوبلاست بماصة باستير وينقل إلى بيئة غذائية. ويؤخذ جزء بسيط من المخلول للفحص وتحديد كمية البروتوبلاست المفصول.

وبهذه الطريقة يمكن فصل ٢,٥ x ١٠^٦ خلية بروتوبلاست بكل دورق سعة ٢٥٠ مليلتر. وبزراعة البروتوبلاست بتركيز ٢,٥ x ١٠^٦ / مليلتر في بيئة سائلة تحتوي على أملاح العناصر الغذائية + ٢ ملليجرام/ لتر NAA تركيز + ٠,٥ ملليجرام/ لتر BAP + ٩٪ مانيتول يبدأ البروتوبلاست في النمو بكفاءة عالية .

مكونات أملاح (CPW):

- فوسفات بوتاسيوم ثنائي الإيدروجين KH_2PO_4 بتركيز ٢٧,٢ ملليجرام/ لتر.
- نترات بوتاسيوم KNO_3 بتركيز ١٠١ ملليجرام/ لتر.
- كلوريد كالسيوم $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ بتركيز ١٤٨٠ ملليجرام/ لتر.
- يوديد بوتاسيوم KI بتركيز ٠,١٦ ملليجرام/ لتر.
- سلفات ماغنسيوم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ بتركيز ٢٤٦ ملليجرام/ لتر.
- سلفات نحاس $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ بتركيز ٠,٠٢٥ ملليجرام/ لتر.

(أ) استخدام خليط الإنزيمات لفصل بروتوبلاست من أوراق نبات التبغ

١- تزرع بذور التبغ في ظلام تام وحرارة ٢١°م لإنتاج بادرات. ثم تنقل البادرات إلى صوبة زجاجية تحت ظروف إضاءة شدتها ٩٠٠٠ لكس لمدة ١٦ ساعة يوميا

وحرارة ٢٥-٢٨°م. تنقل النباتات إلى إصص قطر ١٢ سم تحت إضاءة ١١ ألف لكس. وتروى النباتات بالنشع من أسفل الأصيص.

٢- تجمع الأوراق كاملة القمعد بعد ٦٠ يوما من الإنبات. ثم تعقم الأسطح الخارجية للأوراق بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم التجاري، ثم تغسل عدة مرات بماء معقم لإزالة الآثار المتبقية من مادة التعقيم. ثم تترك الأوراق حتى تذبل ويترهل قوامها، ثم تزال وتستبعد بشرتها السفلى، ثم تقطع الأوراق إلى أجزاء صغيرة وتفرد في أطباق بترى ١٤سم، ويضاف إلى الأجزاء الورقية محلول مانيتول بتركيز ١٣٪ يحتوى على أملاح (CPW) بعد ضبط حموضته عند 5.8 pH باستخدام حمض هيدروكلوريك تركيز ٥ عيارى.

٣- يسحب محلول المانيتول وأملاح (CPW) من أسفل الأوراق المجزأة بعد ١-٢ ساعة، ويوضع بدلا منها ٢٠ مليلتر من خليط إنزيمات معقمة بمرشحات التعقيم يشمل ٤٪ Maccrozyme + ١٣٪ Mannitol + ٤٪ Meicelase. + أملاح CPW وتضبط الحموضة عند 5.8 pH. ثم يحضن الخليط والأوراق المجزأة لمدة ٨ ساعات عند ٢٧°م وظلام تام مع تحريك الأوراق بملقط لتسهيل خروج البروتوبلاست. ثم يترك البروتوبلاست فى نفس الظروف لمدة ٣٠ دقيقة، ثم تستبعد الإنزيمات بماصة باستير Pasteur pipette.

٤- ينقل البروتوبلاست إلى أنبوبة اختبار لها غطاء محكم ويضاف إليه محلول المانيتول وأملاح CPW. ثم تثبت الأنابيب على جهاز طرد مركزي يعمل بسرعة ٣٥ دورة فى الدقيقة لمدة ٥ دقائق، ثم تستبدل البيئة بمحلول ٢٠٪ مانيتول وأملاح CPW. ثم تثبت الأنابيب مرة ثانية على جهاز الطرد المركزي يعمل بسرعة ٥٠ دورة/ الدقيقة ولمدة ١٠ دقائق، يطفو بعدها البروتوبلاست على السطح حيث يسحب بماصة باستير. ثم يضاف إليه ١٠ مليلتر بعد فصله من محلول المانيتول وأملاح CPW وتؤخذ منها عينات للفحص. ويلاحظ أن حطام الخلايا تستقر فى قاع الأنابيب حيث تستبعد بعد رفعها من جهاز الطرد المركزي.

(ب) استخدام تعاقب الإنزيمات لفصل بروتوبلاست من أوراق نبات التبغ

تستخدم هذه الطريقة فى دراسة الفيروسات التى تصيب أوراق نبات التبغ. وتتخلص فى اختيار نباتات عمر ٦٠ - ٧٠ يوما نامية فى أصص عند ٢٢-٢٥ م^٢ وشدة إضاءة ١٠-١١ ألف لكس، وفترة إضاءة ١٦ ساعة يوميا من مصابيح فلوروسنت بيضاء. ويفصل البروتوبلاست من أوراق غير مكتملة الانبساط بطول ٢٠-٢٥ سم، تقع بين الورقة السادسة والتاسعة من قمة النبات. وتتخلص هذه الطريقة فيما يلى: تعقم الأوراق ثم تغسل باماء المقطر المعقم للتخلص من بقايا مواد التعقيم، ثم تستبعد البشرة السفلية.

تقطع الأوراق منزوعة البشرة السفلية إلى قطع وتوضع فى ٢٠ مليلتر من محلول معقم بفلتر تعقيم يحتوى على ١٣٪ Mannitol + ٩٪ Macerozyme + ١٪ Potas-sium dextranuphate، وتضبط حموضته عند 5.8 pH باستخدام حمض هيدروكلوريك تركيز ٢ عيارى، ويساعد هذا المحلول على ذبول الأجزاء الورقية. ثم يحمل المحلول المحتوى على الأوراق المجزأة على جهاز هزاز يعمل بسرعة ١٠٠-١٢٠ دورة/الدقيقة عند حرارة ٢٥ م^٢.

تجمع الخلايا المفصولة من الأجزاء الورقية منزوعة البشرة على مراحل بعد ٣٠، ٧٥، ١٢٠، ١٨٠ دقيقة من بدء عمل الهزاز، على أن تستبدل البيئة الغذائية بعد كل فترة زمنية ببيئة مماثلة طازجة. مع ملاحظة أن المرحلتين الأخيرتين من تجميع الخلايا محتوية على خلايا يرانشيمية.

توضع الخلايا فى جهاز طرد مركزى سرعته ١٠٠-٢٠٠ دورة/الدقيقة لمدة ٢-٣ دقيقة، ثم تغسل مرتين بمحلول مانيتول حديث التحضير بتركيز ١٣٪ ويعاد وضعها فى جهاز الطرد المركزى.

بعد الخطوات السابقة توضع الخلايا المفصولة فى ٤٠ مليلتر من إنزيم Cel-lulase الخام بتركيز ٤٪ مضاف إليه ١٣٪ مانيتول، وتضبط الحموضة عند 5.8 pH باستخدام حمض هيدروكلوريك تركيز ٢ عيارى قبل التعقيم بمرشحات التعقيم. ثم

تحضن الخلايا المعلقة عند ٣٦°م لمدة ٣-٣,٥ ساعة مع مراعاة وجود قضيب يتحرك بصورة محورية لمنع تكتل وتجمع الخلايا خلال فترة إزالة الجدار الخلوى. بعد انتهاء الفترة الزمنية المحددة تنقل الخلايا مع البيئة الغذائية إلى جهاز طرد مركزى مرة ثانية يعمل بسرعة ١٠٠ دورة/ الدقيقة ولمدة دقيقة واحدة. تغسل بعدها مرتين بمحلول المانيتول تركيز ١٣٪ مضاف إليه كلوريد الكالسيوم تركيز ٠,١ ملليمولر. ويعاد تثبيتها مرة ثانية على جهاز طرد مركزى كما فى المرة السابقة، بعد ذلك يتم فصل البروتوبلاست باستخدام ٥ مليلتر من المانيتول.

(ج) فصل بروتوبلاست من أنسجة غير ورقية

يفضل فصل البروتوبلاست من أنسجة ورقية ولا يفضل استخلاصه من أنسجة أخرى. وقد يرجع ذلك إلى صعوبة تحديد التركيب الإنزيمى المناسب لفصل البروتوبلاست من هذه الأنسجة. وصعوبة تغلغل الإنزيمات بين الخلايا. ويمكن فصل البروتوبلاست من الخلايا البرانشيمية وغيرها باستخدام نفس الإنزيمات المذكورة سابقا إذا كان لها جدار خلوى رقيق. ويستلزم استخدام كميات كبيرة من إنزيم Pectinase عند فصل البروتوبلاست من الثمار المحتوية على نسبة عالية من البكتين. ويمكن الحصول على البروتوبلاست من حبوب اللقاح باستخدام إنزيم Helicase المحضر بطريقة التجفيف بالتجميد حيث يتميز باحتوائه على إنزيم B-1-3 Gglucanase ذى القدرة العالية على هضم مادة الكالوس Callose الموجودة فى الجدار الخلوى، ووجود ترسيبات كبيرة من مادة Sporopollinin على جدر حبوب اللقاح يكون سببا لإعاقة استخلاص البروتوبلاست منها بواسطة الإنزيمات.

٥- مرحلة تنقية البروتوبلاست

بعد الحصول على البروتوبلاست، يرشح خلال مناخل ٣٣-١٠٠ ميكرومتر من الصلب أو النيلسون للتخلص من بقايا جدر الخلايا وغيرها. ثم يحمل الراشح

على جهاز طرد مركزي يعمل بسرعة منخفضة مع التكرار بعد إضافة محلول ٢١٪ سكروز، حيث إن الطرد المركزي السريع يحدث أضرارا شديدة للبروتوبلاست لرقته. ثم يجمع البروتوبلاست المتكتل على السطح. ويراعى أن وجود منظمات نمو مختلفة في البيئة تسبب تغييرا في عملية البناء الضوئي للبروتوبلاست، ومنع تكوين جدر خلوية جديدة ونمو الخلايا. وقد يتغير شكل البروتوبلاست ويصبح غير كروي ويستمر ذلك لمدة طويلة. فإذا توفرت الظروف المناسبة تنقسم خلايا البروتوبلاست، وقد يكون الانقسام في المرحلة الأولى مضطربا غير متناظر أو شاذ، وربما يرجع ذلك إلى فقد مواقع المعلومات بالخلية Information positions نتيجة تدهور شبكة البلازموذوماتا Plasmodesmata. وبذلك يتدهور الاتصال بين الخلايا ويتغير النظام الهيكلي للخلية Cytoskeleton pattern، ويحدث تغيير في نظام الإمداد بالعناصر وفي حجم ومساحة أسطح الخلايا، ويتوقف التيار السيتوبلازمي Cytoplasmic stream لمدة تصل إلى ٢٤ ساعة بعد فصل النسيج.

أسباب انخفاض محصول البروتوبلاست من الخلايا

بالرغم من توفر الظروف المثلى فإن أكبر كمية مستخلصة من البروتوبلاست حوالى ٣٠٪. وأسباب ذلك:

١- مقاومة جدر الخلايا إلى فعل إنزيم Cellulase. ولذلك يمكن استخدام أنواع مختلفة من الإنزيمات مثل Maccrozyme R10; Onosuka R10; Driselase. ويعتبر أفضل تركيز لإنزيم Cellulase R10 هو ١٪، وأفضل تركيز لإنزيم Macerozyme R10 هو ٠,٢٪.

٢- سرعة موت خلايا عديدة بعد نقلها من بيئة غذائية إلى بيئة أخرى عند رفع الضغط الأسموزي للخلايا من أجل تحرير البروتوبلاست من الجدر الخارجية للخلايا. وقد يستخدم السكروز بدلا من المانيتول بهدف زيادة الضغط الأسموزي، بالرغم من أن السكروز يؤدي إلى خفض كمية البروتوبلاست المستخلصة بصورة واضحة جدا.

٣- تتأثر كمية البروتوبلاست المستخلصة من الخلايا المعلقة والأنسجة النباتية بمرحلة النمو. وتعتبر مرحلة الانقسام السريع للخلايا المعلقة في البيئة الغذائية هي أفضل المراحل بالمقارنة بمرحلة الثبات العددي للخلايا، وثبت أن هذه الفترة كانت بعد ٤-٥ أيام من الزراعة العملية لنبات التبغ.

٦- مرحلة اندماج البروتوبلاست Protoplast fusion

خاصية اندماج البروتوبلاست

يتميز البروتوبلاست بقدرته على الاندماج الذاتي والتكتل، ويمكن الاستفادة من هذه الخاصية في دمج بروتوبلاست خلايا جسمية نباتية وإنتاج خلايا هجينية منها. وتختلف سرعة الاندماج والتكتل باختلاف النوع النباتي. فقد يندمج البروتوبلاست بعد فصله مباشرة إذا تعرض لبعض العوامل الطبيعية. وقد يحتاج بعض الوقت حتى يندمج. وقد تنخفض قدرته على الاندماج والتكتل تدريجياً بمرور الفترة الزمنية عقب فصله. لذلك يفضل تحديد الفترة الحرجة لكل نوع نباتي، وهي الفترة الزمنية التي يقضيها البروتوبلاست المفصول قبل اندماجه. ويؤدي الفصل البطيء للبروتوبلاست إلى حدوث اندماج بين خلايا النسيج الواحد، وهو ما يسمى بالاندماج الذاتي للخلايا Spontaneous fusion، ويحدث الاندماج الذاتي أثناء هضم الجدار الخلوي باستخدام الإنزيمات. حيث تبدأ الخيوط البلازميدية Plasmodesmata التي تربط الخلايا ببعضها بالتعدد والزيادة في الحجم والانتشار في مساحة أكبر مما يسمح بانتقال محتويات خلية إلى خلية أخرى مجاورة لها. وعلى هذا الأساس فإن ظاهرة الاندماج الذاتي تعتمد على صفات الأنسجة النباتية ودرجة تعقيدها. ولا يكفي وجود التقارب بين البروتوبلاست لحدوث الاندماج بل يتطلب أيضاً أن تكون الشبكة البلازميدية متقاربة وعلى بعد أقل من واحد ملليمتر. والبروتوبلاست المفصول من خلايا معلقة يكون غنياً بالسيتوبلازم ويكون أكثر قابلية على الاندماج بالمقارنة بالبروتوبلاست المفصول من الطبقة الوسطى للورقة، وقد يرجع ذلك إلى أن بروتوبلاست الطبقة الوسطى

للورقة يحتوى على طبقة رقيقة من السيتوبلازم حول الفجوة العصارية كبيرة الحجم بجانب وجود جسيمات أخرى مثل الكلوروبلاست. وبالفحص المجهرى تظهر بعض التغيرات فى البروتوبلاست عقب فصله مباشرة مثل وجود بروتوبلاست يحتوى على نواتين Nucleus، وقد يرجع ذلك إلى أن الخلية أثناء فصل البروتوبلاست كانت فى مرحلة انقسام أو فى أطوارها النهائية من الانقسام.

أهداف اندماج البروتوبلاست

بإزالة جدر الخلايا يصبح البروتوبلاست عاريا وقابلا للتداول لعديد من الممارسات العملية والوراثية مثل:

١- اندماج مجموعتين كاملتين من المجموعات الكروموسومية Genomes وإنتاج هجين منهما.

٢- نقل جزء من المجموعة الجينية من بروتوبلاست واهب إلى بروتوبلاست مستقبل لإنتاج هجن غير متناظرة جزئيا Partial asymmetric.

٣- نقل جسيمات Organelles (يسمى هجين سيتوبلازمى Cybrid) مثل الكلوروبلاست والميتوكوندريا بهدف نقل صفة معينة مثل مقاومة المبيدات أو مقاومة الحشائش أو نقل صفة العقم الذكري السيتوبلازمى.

طرق دمج البروتوبلاست (تهجين البروتوبلاست)

١- الاندماج باستخدام مركبات كيميائية Chemically- induced fusion

لتشجيع اندماج البروتوبلاست، يجب أن تكون الأغشية البلازمية -Plasma mem branes فى تلامس تام. ونظرا لوجود شحنة سالبة على سطح البروتوبلاست تعمل على حدوث تنافر بين البروتوبلاست المتجاور، لذلك يجب التخلص من الشحنات السالبة لمنع التنافر بين البروتوبلاست المتجاور ويتم الاندماج بسهولة. وتستخدم وسائل عديدة تعمل على تغيير الشحنات السالبة، منها تغيير الحموضة (pH) أو

إضافة كاتيونات متعددة Polycations أو نزع الماء Dehydration من البروتوبلاست. وقد وجد أن تعريض بروتوبلاست الطبقة الوسطى للورقة إلى بيئة تميل إلى القلوية -تحتوى على أيونات كالسيوم- يؤدي إلى تكوين أعداد كبيرة من البروتوبلاست المندمج، وكانت أفضل النتائج عندما تعرض البروتوبلاست إلى محلول منظم Buffer solution (pH 10.5) والتحضين عنه ٣٧°م لمدة ١٠ - ١٥ دقيقة. ويجب ألا تطول مدة التعريض عن ٤٥ دقيقة حتى لا يؤدي إلى تكوين بروتوبلاست غير ثابت وغير متماسك. واستخدمت هذه الطريقة بنجاح في إحداث الاندماج والتهجين في خلايا جسمية لقبات اليعقونيا.

ويعتبر مركب Polyethylene glycol (PEG) (الوزن الجزيئي ١٥٠٠ - ٦٠٠٠ دالتون) من أكثر المركبات استخداما في الاندماج الكيميائي للبروتوبلاست. وإضافة هذا المركب بجرعات متتالية إلى معلق البروتوبلاست يؤدي إلى تجمعه Agglutination بنسبة ١ - ١٠٪، ثم يتبع ذلك التخلص من هذا المركب بإضافة محلول منظم حموضته (pH 9-11) يحتوى على نسبة مرتفعة نسبيا من أيونات الكالسيوم (١٠ - ١٥ ملليمول). وميكانيكية هذا الاندماج قد تكون ناتجة عن حدوث انتشار جانبي للبروتينات الملائمة للأغشية وخلق مناطق غنية في الليبيدات غير مستقرة تؤدي إلى الاندماج. وقد لا تؤدي طرق الاندماج الكيميائي إلى النتيجة المتوقعة وقد يرجع ذلك إلى أن بروتوبلاست بعض الأنواع النباتية لا يتحمل التعرض للمركب (PEG). كذلك يختلف تأثير هذه المادة في التخلص من الشحنات السالبة الموجودة على سطح البروتوبلاست باختلاف وزنها الجزيئي وتركيزها وكثافة البروتوبلاست في البيئة الغذائية ودرجة حرارة التحضين وكثافة الشحنات الموجبة المضافة للبيئة. وقد ثبت أن مادة (PEG) ذات الوزن الجزيئي ١٥٤٠ هي الأفضل من استخدام أوزان جزيئية أقل أو أعلى من ذلك، وتستخدم بتركيز لا يقل عن ٣١٪ وتحضن عند ٣٥°م ثم ١٥°م. كذلك ثبت نجاح طريقة تكتل بروتوبلاست الجزر وثلاثة أنواع من التبغ وهم *N. stocktonii*; *N. tabacum* *N. nesophila*; باستخدام الفصل الإنزيمي ثم تعريض البروتوبلاست المفصول لجهاز مميز الخلايا "Cell Storter - Flow Cytometer" عند

طول موجة ٥١٤ نانوميتر وإشعاع ضوئي مرئي مقداره «400 mW» باستخدام فلاتر LP 590; FT 560; BG 38; LP 510 مما يؤدي إلى تحفيز الاندماج بنسبة كبيرة. ويستخدم الدكستران Dextran بنجاح مع بروتوبلاست نباتات *Petunia hybrida*; *Brassica pekinensis*; *Nicotiana tabacum* لدمجها مع بروتوبلاست الجزر، ويتم ذلك في الخطوات الآتية:

– يستخلص بروتوبلاست النباتات الثلاثة المذكورة وكذلك بروتوبلاست نبات الجزر كل على حدة.

– يخلط ١٠ مليلتر من بروتوبلاست الجزر مع مقدار مساو له من أى من البروتوبلاست الثلاثة، ثم يكرر ذلك مع بروتوبلاست الأثنين الآخرين، ثم يوضع كل خليط منهم في محلول ٠,٥٥ مولر مانيتول.

– ينقل ٠,٤ مليلتر من بيئة الاندماج (متكونة من ١٥٪ دكستران +Dextran واحد مولر كلوريد صوديوم لكل طبق بقرى بلاستيك يحتوى على ٠,٢ مليلتر بروتوبلاست. ثم يضاف لكل طبق بقرى ٠,٤ مليلتر من بيئة الاندماج مرة ثانية. ثم تحضن الأطباق عند ٣٠°م لمدة ١٥ دقيقة، بعدها يضاف ٠,٢ مليلتر كلوريد صوديوم تركيز ١,٣٦ مولر. وبعد مرور ١٥ دقيقة أخرى يتم تخفيف المحلول بإضافة ٥ مليلتر بيئة غذائية مضافا إليها مانيتول تركيز ٠,٢٧ مولر ومواد أخرى غير عضوية بتركيز ٠,١٣ مولر. ثم يحضن الخليط عند ٥°م لمدة ساعة واحدة فقط، بعدها تنقل إلى الغرفة العادية. وبعد ٢٤ ساعة يجمع البروتوبلاست ويفحص.

٢- الاندماج الكهربائي Electrofusion

(أ) المرحلة الأولى

يوضع البروتوبلاست في بيئة غذائية منخفضة التوصيل الكهربائي بين قطبين كهربائيين Two electrodes وتردد مرتفع بين القطبين (0.5-1.5 Mhz). وبواسطة «فصل كهربائي ثنائية» Dielectrophoresis على جهاز الكترافوريسيس تصبح

الشحنة على سطح البروتوبلاست مستقطبة وكأنها ثنائية القطبين Dipoles. وأثناء هجرة البروتوبلاست على طول خطوط المجال الكهربائي تتلامس مع بعضها وتكوين ما يسمى سلاسل اللؤلؤ Pearl chains موازية لخطوط المجالات الكهربائية المستخدمة. ويتوقف طول السلاسل على كثافة البروتوبلاست وقوة المجال الكهربائي وطول مدة تطبيق المجال الكهربائي. ويفضل استخدام مجالات كهربائية متجانسة Uniform fields بين الإلكترودات Electrodes بينهما مسافات حوالى ٥ ملليمتر، حيث تهاجر خلايا البروتوبلاست نحو هذه الإلكترودات، وتتكون عليها سلاسل مركزة من البروتوبلاست غير مشتهة إلى إلكترودات أخرى وبكميات كبيرة بحيث يسهل ملاحظتها والتعامل معها. وتستخدم عادة خمسة إلكترودات متوازية مصنوعة من الصلب غير قابل للصدأ مثبتة فى وعاء من البرسبكس Perspex حجمة ٥,٥ مليلتر. ومن الممكن أن تندمج ٥,٥ - ١ x ١٠^٦ بروتوبلاست فى الدورة الواحدة التى تستغرق ٦٠ - ٩٠ ثانية. ومن الممكن أيضا استخدام بدائل للإلكترودات وخلايا كهربائية مغايرة للتصميم المذكور. وقد وجد أن النسبة الكلية المندمجة تصل إلى ٦٠٪ فى خليط مكون من عشرين من البروتوبلاست بنسبة ١ : ١. ولوحظ أن ٥٠٪ من هذه النسبة يحدث بها اندماج بنسبة ١ : ١ داخلى بين خلايا عشيرة واحدة متماثلة و ٥٠٪ يحدث اندماج بين خلايا العشرين مكونة خلايا هجينية خليطة النواة Heterokaryons.

(ب) المرحلة الثانية

تعريض سلاسل البروتوبلاست إلى نبضات كهربائية مباشرة بجهد (3-1) kVcm وقصيرة ما بين ١٠ - ٢٠٠ ميكروثانية كافية لإحداث ثقب Electro-poration فى الغشاء المحيط بالبروتوبلاست والأغشية التى فى تماس مع بعضها وبذلك يسهل دمج البروتوبلاست. ومن الممكن إدخال DNA وجسيمات أخرى إلى البروتوبلاست مباشرة. ويستخدم جهاز إطلاق النبضات الكهربائية Capacitor discharge "spike" pulses لدمج البروتوبلاست. وتتميز طريقة الاندماج الكهربائي

للبروتوبلاست بتفوقها على الطريقة الكيميائية. وأن البروتوبلاست المتلاصق في سلاسل هو المستهدف. كما يمكن توليد ومضات ذات جهد كهربائي مختلف، ويمكن عد البروتوبلاست المندمج.

العوامل المؤثرة في اندماج البروتوبلاست

- مصدر البروتوبلاست، إن اندماج البروتوبلاست المنفصول من أوراق النوع البري للبطاطس *Solanum brevidens* أسرع من اندماج البروتوبلاست المنفصول من معلق خلايا نفس النوع المؤقلم للزراعة التقليدية.

- الومضات الطويلة للجهد الكهربائي (القولت) الأعلى تحقق اندماجا أكثر.

- البروتوبلاست كبير الحجم أسرع في الاندماج من صغير الحجم. وسلاسل البروتوبلاست الأطول تعطي اندماجا متكررا أكثر من السلاسل القصيرة. لذلك يعامل البروتوبلاست الأصغر حجما مسبقا بمادة *Spermine* لكي يعمل على زيادة مساحة أغشية البروتوبلاست المتماسكة وتجمعة في سلاسل.

- يعمل كلوريد الكالسيوم على زيادة نسبة الاندماج بإزالة الشحنات السالبة على أسطح البروتوبلاست، بينما مادة نترات الصوديوم المستخدمة أحيانا في إزالة الشحنات السالبة تحقق نتائج أقل كثيرا. لذلك يفضل احتواء بيئة الاندماج *Fusion medium* على مانيتول *Manitol* + واحد ملليمولر كلوريد كالسيوم $CaCl_2$. وبهذه المعاملة يرتفع نسبة اندماج البروتوبلاست من ٣٠٪ إلى ٦٠٪.

- يحدث الدمج عادة بالتحضين في تركيز مرتفع من مركب (PEG) وتركيز مرتفع من أيونات الكالسيوم (Ca^{++}) ورقم حموضة مرتفع نسبيا (يعمل إلى القلوية). وهذه العوامل ضرورية لإزالة الشحنات السالبة الموجودة على البروتوبلاست. على أن يتم التخلص من آثار المخلوط (PEG) و (Ca^{++}) بالغسيل بعد إتمام الاندماج. والمتوقع نجاحا عظيما لطريقة الدمج الكهربائي، حيث تؤدي إلى الحصول على كثير من البروتوبلاست الحي أكثر من استخدام مركب (PEG). كما حقق دمجا للبروتوبلاست باستخدام مركب *Dextran* ومنشط كهربائي.

٧- مرحلة عزل البروتوبلاست المندمج

Selection of somatic hybrid cells

● عزل مباشر تحت ميكروسكوب Direct isolation

تشطف الخلايا الهجينية المندمجة بماصة ميكرومترية Micropipett أو بأنبوبة شعيرية Micro capillary متصلة بمرنجة Syringe لها قلاووظ محكم. وتشطف الخلايا ذات الأنوية المندمجة Heterokaryons واحدة بعد الأخرى تحت ميكروسكوب ضوئي. وبالرؤية المباشرة يمكن بسهولة تمييز البروتوبلاست الهجين من بين بروتوبلاست الأوراق وبروتوبلاست الخلايا المعلقة.

● الرؤية بالعين Visual method

أحيانا يمكن تمييز الخلايا الهجينية ذات الأنوية المندمجة بالعين المجردة إذا كانت متميزة بصفة معينة عن غيرها في اللون وحجم البروتوبلاست. فمثلا يمكن تمييز الخلايا الهجينية الخالية من الكلوروفيل بسهولة إذا كانت ناتجة من اندماج خلايا لا تحتوى على كلوروفيل أو تمييزها بوجود خيوط سيتوبلازمية وكلوربلاست إذا اندمج سيتوبلازم خلية تحتوى على كلوروفيل وسيتوبلازم لا يحتوى على كلوروفيل.

● استخدام جهاز مميز الخلايا Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)

ويسمى أيضا Continuous flow cytometer. وتعتمد هذه الطريقة على تلوين بروتوبلاست خلايا النوعين المطلوب دمجهما كل بلون خاص مختلف عن الآخر. وتستخدم صبغات وميضية Fluorescent dyes مختلفة (تسمى دلائل وميضية -Fluorescence markers) مثل Fluorescein أو Rhodamine. وباستخدام جهاز مميز الخلايا

Cell Sorter يمكن تمييز وانتخاب وفصل الخلايا ذات النواة الهجينية ذات الألوان المختلفة وذلك بتمرير خلايا البروتوبلاست المندمجة وغير المندمجة في جهاز مميز الخلايا حيث تمتص الخلايا الهجينية الطاقة الضوئية ثم تنبعث منها في صورة وميض ضوئي مختلف.

● الطرق الطبيعية للفصل Separation on physical characteristics

حققت الطرق الطبيعية تقدما كبيرا في تمييز الخلايا الهجينية. حيث تستخدم طريقة التمييز بين الشحنة الكهربائية المنتشرة على سطح الخلايا الهجينية ومقارنتها بالشحنة المنتشرة على بروتوبلاست الآباء. واختلاف تأثير الطرد المركزي على الخلايا الهجينية بالمقارنة بالآباء. وهى طرق يمكن أن تؤدي إلى نتائج جيدة فى حالة الكثافة العالية من الخلايا الهجينية فى البيئة الغذائية ولكن يجب عدم الاعتماد عليها بصورة مطلقة.

٨- مرحلة الانتخاب المعملی للطفرات من الهجن الجسمیة

قد تحدث طفرات ذاتية فى الهجن الجسمیة الناتجة من اندماج بروتوبلاست خليتين من خلايا الصنف النباتی النامی فى البيئة الغذائية أو تحدث فى هجن جسمیة ناتجة من اندماج بروتوبلاست مستخلص من خليتين مختلفتين فى الصنف أو النوع أو الجنس أو العائلة. ويمكن استحداث طفرات فى الخلايا الجسمیة المندمجة بتعريضها لبعض المطفرات مثل Nitro-ureum أو أشعة جاما أو أشعة إكس أو بنقل جينات أو إحداث تغيير فى تركيب الحمض النووى DNA. وعند انتخاب طفرات من الهجن الجسمیة للبروتوبلاست يتم التركيز على الخلايا الهجینیة ذات الصفات غیر العادية. ويفضل الإبقاء على الخلايا غیر المعاملة بالمطفرات للمقارنة مع الخلايا المعاملة مع الاهتمام بمتابعة كل خلية منتخبة بمفردها من حیث التكاثر والتكشف والنمو للحصول على سلالة خلوية Cell line.

طرق الانتخاب المعملية للطفرات

(أ) الانتخاب المباشر للطفرات

تنتخب الطفرات من المزارع المعملية للبروتوبلاست أو من معلق الخلايا التي تتميز بالقدرة على النمو تحت ظروف غير عادية من الإجهاد البيئي مثل الملوحة والجفاف والمضادات الحيوية والسموم النباتية Phytotoxins والعناصر الثقيلة وغيرها.

(ب) طرق تحليلية لصفات الهجن الجسمية hybrids

١- تحليل مشابه الإنزيم Isoenzyme analysis

يتم تحليل الآباء الداخلة في التهجين وتحليل الهجين الناتج نفسه باستخدام جهاز الإلكتروليزيس حيث تظهر حزم مختلفة من البروتين على الجيل *Gel*. ويظهر للهجين تعبير جيني عن بعض الحزم مشابها في ذلك أحد الأبوين. وربما تظهر حزم إضافية مشتقة من تركيبات جديدة ناتجة من وحدات إنزيمية فرعية. ومن مشابهاة الإنزيم المستعملة كدلائل Glucose-6-phosphate dehydrogenase; Phosphoglucose isomerase; Glutamine oxaloacetate transaminase; Esterase and shikimate dehydrogenase

٢- تحليل جزئي "دنا" بالنواة Nuclear DNA analysis

يستخلص الحمض النووي DNA من الكروموسومات أو من الكلوروبلاست أو الميتوكوندريا ثم يجرأ إلى شظايا Fragments باستخدام إنزيمات قطع Restriction enzymes. ثم ترقم إحدى الشظايا بالفوسفور المشع (^{32}P) وتلصق بجزء DNA آخر، فسوف يظهر في الهجن الناتجة طرز مختلفة لحزم هجينية Hybridization bands من DNA يمكن متابعتها باستخدام الأوتوراديوجرام Autoradiograms.

٣- النشاط الإنزيمى Enzyme activity

إذا استخدمت طفرتان تتميزان بخاصية نقص إنزيم Nitrate reductase deficient (NR-) خاص باختزال النترات، أى إنهما لا يستطيعان الاستفادة من النترات كمصدر للنيتروجين. فإن الهجن الناتجة منهما قد تختلفان عن الآباء وتكون لها القدرة على الاستفادة من النترات كمصدر للنيتروجين لاحتوائها على إنزيم Nitrate reductase وفى هذه الحالة يمكن تقدير نشاط الإنزيم.

٤- المظهر الخارجى Morphology

قد يظهر على الهجن الجسمية صفات ظاهرية محددة أو ظهور بعض الصبغات مثل الأنثوسيانين Anthocyanin أو وجود شعيرات على سطح الورقة. وقد تكون بعض هذه الصفات موروثية من الأب أو الأم. وقد تظهر صفات جديدة فى الهجن غير موجودة أصلا فى الآباء مثل ظهور صبغة قرمزية اللون على السطح الخارجى من درنات البطاطس الهجن وظهور لون أصفر أو أحمر فى لحم الدرنة.

٥- تحليل سيتولوجى Cytological analysis

يمكن تقدير تكامل الكروموسومات للهجن الجسمية بطريقة روتينية بواسطة الضغط بشدة على قمة الجذر واستخلاص الكروموسومات من كلا الأبوين. وتبين التحاليل الهجن التى تملك التكامل المتوقع للكروموسومات القادمة من كلا الأبوين، كما يمكن تمييز الانقسامات الشاذة Aneuploidy.

٦- تحليل الصفات المرغوبة Analysis of desired characters

تقدر الصفات الزراعية المرغوبة مثل مقاومة الأمراض والصفات القياسية المعروفة لدى مربى النباتات.

٩- مرحلة تكوين جدر جديدة للبروتوبلاست المندمج

تكوين الجدار الخلوى للبروتوبلاست المندمج من المراحل الهامة فى زراعة البروتوبلاست. حيث يرتبط انقسام الخلية ونموها بتكوين الجدار الخلوى للبروتوبلاست. وتبدأ مرحلة نشوء الجدار الخلوى الجديد بعد نقل البروتوبلاست إلى بيئة خالية من الإنزيمات المحللة للسليولوز. فبعد ١٦ ساعة من نقل بروتوبلاست القبع فى بيئة غذائية يزداد تكوين لويقات سليولوزية على السطح الخارجى من البروتوبلاست. وبعد يومين تتكون جدر خلوية جديدة لحوالى ٦٠ - ٨٠٪ من البروتوبلاست. وبعد ثلاثة أيام من الزراعة تتكون جدر خلوية لجميع البروتوبلاست. وأثناء هذه المرحلة يستلزم المحافظة على الضغط الأسموزى للبروتوبلاست فى البيئة الغذائية عند الحد الأمثل - يتناسب مع زراعة ونمو البروتوبلاست - حتى لا تحدث أى تغييرات غير مرغوبة فى بناء خلية البروتوبلاست. لذلك يجب أن يكون تركيز أيونات الكالسيوم (Ca^{++}) مرتفعة والجهد الأسموزى السالب للبيئة منخفضاً خلال إعادة تكوين الجدار الجديد حول البروتوبلاست، ثم يرفع الجهد الأسموزى للبيئة تدريجياً خلال الأيام القليلة من بدء تكوين الجدار الخلوى. ويحدث أول انقسام للخلية الجديدة بعد ٢ - ٧ أيام من زراعة البروتوبلاست. وتتحول الزراعة فى هذه المرحلة من زراعة بروتوبلاست إلى زراعة خلايا نباتية عادية. لذلك تحفز الخلايا الجديدة على الانقسام والنمو والتكشف إلى أعضاء نباتية مختلفة حتى يتم تكوين النبات الكامل. وتستخدم مادة Calcaflour White ST بتركيز ٠,١٪ للكشف عن تكوين الجدار الخلوى الجديد. ويتميز هذا المركب بقدرته على انعكاس الضوء الساقط عليه من مصدر للضوء الأزرق. ويعامل البروتوبلاست بهذا المركب سواء كان فى بيئة سائلة أو صلبة. حيث توضع الخلايا المتكونة حديثاً لمدة ٥ دقائق مع مراعاة الحفاظ على الضغط الأسموزى وغسل الخلايا بعد ذلك لإزالة المتبقى من هذه المادة. وتفحص تحت الضوء الأزرق. فالخلايا التى كونت جداراً يكون لها القدرة على انعكاس الضوء الأزرق. وبفى بهذا الغرض مصباح زئبقى يحتوى على فلتر إنارة BG 12 وفلتر مكثف K 510. ولوحظ أن البروتوبلاست المستخلص من الطبقة

الوسطى لأوراق التبغ استعادت نشاطها وكونت جدارا خلوية بسرعة، وأن حوالى ٦٠-٨٠٪ من هذه الخلايا بدأت فى الانقسام بعد ٤ أيام من زراعتها فى البيئة الغذائية. ويؤدى انقسام هذه الخلايا إلى تكوين كتل من الكالس. ويضاف لبن جوز الهند إلى البيئة الغذائية للحصول على انقسام خلوى جيد والحصول على كتل من الكالس، ويمكن تحفيز خلايا الكالس على النمو وتكوين أفرع والحصول على نباتات كاملة.

١٠- مرحلة انقسام ونمو خلايا البروتوبلاست المندمج

العوامل المؤثرة فى انقسام ونمو خلايا البروتوبلاست

١- العوامل الوراثية

تنمو بعض أنواع البروتوبلاست بصورة جيدة على بيئة غذائية معينة دون غيرها من النباتات بالرغم من ثبات الظروف البيئية المحيطة، وقد يرجع ذلك إلى أسباب وراثية، حيث تختلف كفاءة انقسام البروتوبلاست باختلاف الأنواع التابعة للجنس بيتونيا *Petunia*، ويصعب انقسام البروتوبلاست المستخلص من النوع *P. paradii* بصرف النظر عن نوع البيئة المستخدمة، بينما البروتوبلاست المستخلص من النوع *P. hybrida* أو من نباتات الجيل الأول للهجين «*P. paradii* x *P. hybrida*» كان سهل الانقسام. كذلك يتأثر نمو البروتوبلاست بمستوى تضاعف العدد الكروموسومى بالخلية. فمثلا قابلية انقسام البروتوبلاست المستخلص من نباتات ثنائية كان مرتفعا بالمقارنة مع بروتوبلاست النباتات الأحادية. ويحتاج البروتوبلاست المستخلص من خلايا الطبقة الوسطى لأوراق نباتات أحادية إلى إضافة معقدات طبيعية إلى البيئة لتشجيعه على الانقسام.

٢- نوع النبات

تختلف كفاءة نمو خلايا البروتوبلاست فى البيئة الغذائية باختلاف الأنواع والأجناس النباتية. فقد نجح ٣٨ جنسا نباتيا من بين ٦٦ جنسا فى إنتاج نباتات

من خلايا البروتوبلاست. وأن بروتوبلاست نبات الأرز هو الأسهل من بين الأجناس التابعة للعائلة النجيلية *Gramineae*. كذلك ينجح إكثار أجناس تابعة للعائلة *So-lanacea* مثل *Capsicum*; *Datura*; *Browallia*; *Lycopersicon*; *Solanum*; *Nicotiana*; وأنواع نباتية تابعة لعائلات نباتية مختلفة مثل *Atropa*; *Petunia*; *Hyocyamus*; *Daucus carota*; *Medicago sativa*; *Brassica napus*; *Asparagus officinalis*; *Mani-hot esculenta*; *Trifolium repens*; *sinesis Citrus*. ولم تصل الأنواع التابعة للجنس *Nicotiana* إلى مستوى كفاءة النوع *Nicotiana tabacum* من حيث قابليته للانقسام والنمو. وكان النوع *N. sylvestris* أقل كفاءة في الانقسام ونمو البروتوبلاست بالرغم من محاولات تحسين الظروف البيئية المحيطة وتغيير مكونات البيئة. ويعتبر القمح والشعير وغيرهما من محاصيل الحبوب بأنها ضعيفة في إعطاء بروتوبلاست قادر على الانقسام والنمو حتى ولو كان مستخلصا من الطبقة الوسطى للورقة لصعوبة تكوين الجدار الخلوي للبروتوبلاست وعدم القدرة على الانقسام وصعوبة الحصول على كالس من أوراق هذه المحاصيل.

٣- البيئة الغذائية

أثناء فصل البروتوبلاست قد يحدث ضرر للشبكة البلازمية مما يؤدي إلى تسرب بعض مكوناته من السوائل إلى البيئة الغذائية، لذلك تضاف بعض منظمات النمو ومواد أخرى إلى البيئة لتعويض ما تفقده. كما أن هز الدوارق المحتوية على بروتوبلاست بجهاز الرج قد يؤدي إلى تمزق الشبكة البلازمية وتحتيم البروتوبلاست. لذلك يفضل أن يكون البروتوبلاست في بيئة سائلة ساكنة أو متحركة ببطء للمحافظة على البلازميدات ومساعدة البروتوبلاست على الهبوط بسلام إلى قاع الدورق. وثبت أن إضافة ٦ مللى بيئة سائلة حاملة للبروتوبلاست فوق بيئة مائلة مضاف إليها آجار (بيئة ثنائية المظهر) *Two-phases medium* في طبق بترى قطر ٩ سم أعطت نتائج جيدة. واستخدام الأطباق الزجاجية أفضل من البلاستيكية لتجنب التصاق البروتوبلاست على جدر الأطباق البلاستيكية.

ويفضل إضافة ٠,٠٤ - ٠,٠٢٪ مادة ناشرة مثل Tween-80 لمنع الالتصاق. وتستخدم هذه الطريقة بنجاح كبير في زراعة البروتوبلاست. ومن فوائد هذه الطريقة إمكان استبدال البيئة السائلة (الطبقة العلوية في الطبق البترى) ببيئة أخرى مماثلة لنفس البيئة السائلة ولكنها طازجة، ويمكن أيضا إحلال أجزاء من البيئة الصلبة (الطبقة السفلية في الطبق البترى) بأجزاء من بيئة مماثلة صلبة طازجة ونفس الحجم. ويتم هذا الاستبدال في البيئة السائلة والصلبة باستمرار للمحافظة على الضغط الأسموزي وتحفيز الخلايا على النمو والانقسام بصورة منتظمة. وبهذه الطريقة تنشأ تجمعات من خلايا البروتوبلاست وتهبط على طبقة البيئة الصلبة في قاع الطبق وتنمو بنجاح، ويمكن متابعتها ونقلها فيما بعد للإكثار. وتستخدم بنجاح البيئات الجاهزة التي لها نفس مواصفات بيئة (MS) لزراعة البروتوبلاست. وثبت أن إضافة كلوريد الكالسيوم بتركيز ٥ ملليمولر وكبريتات الماغنسيوم بتركيز ٤ ملليمولر للبيئة كان لها القدرة على الحفاظ على الأغشية البلازمية والحصول على نتائج جيدة في زراعة البروتوبلاست المفصول من خلايا الطبقة الوسطى للأوراق.

ويمكن زراعة البروتوبلاست في بيئة سائلة أو صلبة، بالرغم من أن لكل منهما بعض المشاكل. ويفضل أن تحتوي البيئة الصلبة على ٠,٢٪ آجار بدلا من ٠,٦٪، ويفضل النوع Baker Agar بدلا من Difco Agar وإضافة الكازين Casein hydro-lysate أو بعض الأحماض الأمينية مثل الجلوتامين إلى البيئة تعطي نتائج جيدة. ويعتبر السكروز هو المفضل دائما كمصدر للطاقة والكربون، وإضافة الجلوكوز أو الزيلوز Xylose والرايبوز Ribose مجتمعة أو منفردة إلى البيئة تعطي نتائج مفيدة. وإضافة الأكسينات (2,4-D; NAA) والسيتوكاينينات (BAP; KIN) منفردة أو مجتمعة بتركيز ٠,١ - ٥ ملليجرام/ لتر إلى البيئة لها أهمية كبيرة جدا لاستمرار نمو خلايا البروتوبلاست وتحقيق إنتظام وجودة النمو. ويختلف تركيز منظمات النمو في البيئة باختلاف البروتوبلاست ومصدره. أما بالنسبة للمواد الحافظة على

الضغط الأسبوزى فتستخدم نفس المواد المستخدمة فى مرحلة فصل البروتوبلاست. ويعتبر المانيتول بتركيز ٠,٥ - ٠,٦ مولى أكثرها استخداما. ويستخدم كذلك خليط المانيتول + السريبيتول بنجاح أيضا. كما يستخدم سكر الجلوكوز مع بروتوبلاست خلايا نبات الفول البلى وقول الصويا. بينما كان السكروز مفضلا لنمو بروتوبلاست نبات Brome grass.

٤- الظروف البيئية المحيطة

تختلف أنواع البروتوبلاست فى احتياجها للحرارة أثناء التحضين، لذلك يجب تحديد درجة الحرارة المناسبة حتى لا تكون سببا رئيسيا فى تثبيط نمو البروتوبلاست. فمثلا يحضن بروتوبلاست نبات التبغ عند ١٦ - ٣٧°م وبروتوبلاست نبات الطماطم عند ٢٩°م لكى يحقق كفاءة عالية فى النمو والانقسام. وللضوء تأثير كبير فى إنجاح البروتوبلاست خاصة إذا كان مصدره الطبقة الوسطى للأوراق. وتعتبر أفضل شدة إضاءة لبروتوبلاست نبات التبغ هى ٣٣٠٠ لكس، وانخفاض شدة الضوء يؤدى إلى انخفاض قدرة البروتوبلاست على النمو.

٥- كثافة البروتوبلاست فى البيئة الغذائية

كثافة خلايا البروتوبلاست فى البيئة السائلة لها أهمية كبيرة فى طبيعة نموها وتشير الدلائل إلى إمكانية نمو بعض أنواع البروتوبلاست عند كثافة منخفضة جدا تصل إلى ١٠٠٠ بروتوبلاست/ مليلتر بيئة. ويفشل بروتوبلاست نبات التبغ فى الانقسام والنمو إذا كانت كثافته أعلى من ٥ × ١٠ بروتوبلاست/ مليلتر بيئة. وأن الكثافة المثلى التى أعطت أفضل معدل للانقسام والنمو هى ٥ × ١٠ بروتوبلاست/ مليلتر بيئة، ولم يلاحظ أى انقسام عندما كانت كثافة البروتوبلاست ٦ × ١٠ بروتوبلاست/ مليلتر بيئة أو أقل من ذلك. ومن ناحية أخرى وجد أن أفضل كثافة لبروتوبلاست خلايا نبات البيتونيا Petunia هى ٣,٥ × ١٠ / مليلتر.

أهم الممارسات الوراثية للبروتوبلاست المندمج

١- التهجين الجسمى بين أنواع مختلفة Somatic hybridization

يعرف التهجين الجسمى أيضا باسم Para-sexual hybridization. فى الواقع أن دمج البروتوبلاست ليس له ميزة خاصة لإنتاج هجن جسمية فى حالة إذا كان من السهل إنجاز التهجين بالطرق التقليدية. ودمج البروتوبلاست له أهمية كبيرة فى إنتاج خلايا هجينية لبعض المحاصيل التى يصعب تهجينها بالطرق التقليدية لأسباب عدة مثل عدم وجود قرابة أو عدم توافق أو وجود عقم ذكرى أو مسببات أخرى. فإذا اندمج اثنان من البروتوبلاست من نفس النوع النباتى تتكون نواة متجانسة Homokaryon. وإذا اندمج اثنان من البروتوبلاست واندمجت نواتهما وهما مختلفان فى الجنس أو النوع تتكون نواة غير متجانسة Heterokaryon. وفى كلتا الحالتين تندمج النواتان بعد اندماج البروتوبلاست ثم يتكون جدار خلوى حول البروتوبلاست لتتكون خلية جديدة، وبزراعة خلية البروتوبلاست على بيئة غذائية وظروف بيئية مناسبة تنقسم ويتكون منها نبات كامل. وبالرغم من صعوبة التهجين فى الحقل بالطرق التقليدية بين نوعين من البطاطس أحدهما *S. tuberosum* (يكون درنات وغير مقاوم أو قليل المقاومة للأمراض) والثانى *S. brevidens* (لا يكون درنات ومقاوم للأمراض)، فقد نجح التهجين بينهما بدمج البروتوبلاست والحصول على نباتات كاملة من الخلية الهجينية. كذلك تم إنتاج هجيتين أحدهما تابع للجنس *Brassica* وهو «*Brassica oleracea x B. campestris*» والآخر تابع للجنس *Medicago* وهو «*Medicago sativa x M. falcate*» بدمج البروتوبلاست وكان هناك صعوبة فى إنتاج الهجينين بالطريقة التقليدية. وتم الحصول أيضا على الهجين «*Nicotiana glauca x N. langsdorffii*» بدمج البروتوبلاست. وثبت أن الحالات التى ينجح فيها التهجين بين جنسين وإنتاج بذور منهما بالطرق التقليدية هما أيضا قادران على إنتاج هجن بطريقة الدمج بين البروتوبلاست. لذلك يجب اختيار مستعمرات

من البروتوبلاست نجح فيها الاندماج وتكوين هجن على أن يتوفر التوافق بينهما وتندمج جميع محتويات النواتين في نواة هجينية. لأن كثيرا ما يؤدي الاندماج بين البروتوبلاست إلى فشل الأنوية في الاندماج أو فقد بعض الكروموسومات نتيجة لعدم قدرتها على الحركة السريعة واللاحق بمرحلة التناسخ Replication، وبناء على ذلك يمكن أن تفقد أعدادا كبيرة من الخلايا نتيجة بطئها الشديد في النمو وعدم قدرتها على الانقسام. وبعد إتمام اندماج البروتوبلاست تظهر صعوبة في انتخاب الهجن الجسمية Somatic hybrids من مجموعة الخلايا الموجودة. فمثلا إذا حدث تهجين بين بروتوبلاست خليتين مختلفتي المصدر (A) و(B) فإن عشيرة الخلايا الهجينية الناتجة قد تحتوى بعضها على بروتوبلاست غير مندمج من (A) ومن (B) بجانب بروتوبلاست مندمج مكونا هجينا ذات نواة متجانسة (AA) Homokaryons و(BB). وقد تندمج النواتان مكونة نواة هجينية غير متجانسة (AB) Heterokaryons بجانب أنواع مختلفة متعددة الأنوية ومندمجة. وقد حدث تطور في طرق انتخاب الهجين المرغوب (AB). ونجح التهجين الجسمي بين أنواع نباتية كثيرة مثل:

Brassica campestris; *B. oleraceae*; *B. napus*; *Medicago sativa*; *Petunia spp.*;
Lycopersicon lycopersicum; *Solanum tuberosum*; *Daucus carota*; *Nicotiana species*; *Pennisetum americanum*; *Trifolium repens*.

كذلك نجح التهجين الجسمي بين أجناس نباتية مختلفة مثل:

"Solanum tuberosum x Lycopersicon lycopersicum"

"Brassica x Arabidopsis"

"Daucus carota x Aegopodium podagraria"

٢- إنتاج هجن سيتوبلازمية (Cybrids) Cytoplasmic hybrids

هى طريقة مازالت في مراحلها الأولى لانخفاض نسبة نجاحها. حيث يتم التهجين بدمج بروتوبلاست (نواة + سيتوبلازم) لنبات (A) مع سيتوبلازم فقط من نبات (B). وقد نجحت هذه الطريقة في إنتاج هجين سيتوبلازمي *"N. plumbagini-folia x Nicotiana tabacum"* وهذا النوع من التهجين هام في حالة وجود ظاهرة

عقم ذكرى سيتوبلازمى Cytoplasmic male sterility تتحكم فيه جينات محمولة على الميتوكوندريا أو مقاومة بعض الأمراض أو مقاومة لبعض مبيدات الحشائش.

٣- زراعة الأنوية Transplantation of nuclei

تنحصر فى امتصاص نواة خلية ثم زراعتها فى خلية أخرى. أو فصل قطعة من الحمض النووى DNA عليها جين خاص بصفة محددة مثل مقاومة مرض معين، ثم إدخالها على جينوم نبات آخر. وتسمى هذه الطريقة بتهجين الحمض النووى. كذلك تشمل هذه الفكرة على فصل جسيمات مثل البلاستيدات والميتوكوندريا من سيتوبلازم خلية ما ونقلها إلى سيتوبلازم خلية أخرى. وهذه طريقة واحدة من طرق الهندسة الوراثية.

٤- إنتاج نباتات ثنائية ورباعية

يتم ذلك بدمج بروتوبلاست خليتين ثنائية العدد الكروموسومى لإنتاج خلية رباعية Tetraploid. أو دمج بروتوبلاست خليتين أحاديتين Haploids للحصول على نباتات ثنائية Diploids، ثم معاملة النباتات الثنائية بالكولشيسين لإنتاج نباتات رباعية.

٥- التحور الوراثى Transformation

قد يؤدى دمج البروتوبلاست إلى تكامل جينى وظهور صفة فى الهجين الناتج غير موجودة فى الآباء مثل طفرتين من نبات التبغ *Nicotiana tabacum* - الأولى حساسة للضوء (SS vv) والثانية أقل حساسية (ss VV) - والتهجين بينهما أنتج هجيناً (SSss VVvv) غير حساس للضوء وهى صفة غير مقفورة فى الآباء. كذلك وجد أن كلا من نباتى *Nicotiana glauca* و *B. langsdorffii* يحتاج إلى إضافة أكسين النمو إلى البيئة الغذائية، ودمج البروتوبلاست بينهما أنتج هجيناً يتميز بالاكتماء الذاتى من الأكسين المنتج طبيعياً فى خلاياه.

سلبيات التهجين الجسمى Disadvantages of somatic hybridization

لاحظ (Sneep, et al., 1982; Harms, 1983) وجود بعض السلبيات للتهجين الجسمى منها:

- ١- لا توجد طريقة ذات كفاءة عالية للانتخاب. والمنتج النهائى للتهجين الجسمى غالبا يكون عقيما أو متغيرا فى صفاته الخارجية أو غير ثابت وراثيا أو ميتا خصوصا فى حالة اندماج سيتوبلازم لأبوين غير متقاربين.
- ٢- نمو كاييميرا بالكالس Chimeric calluses فى موقع الخلية الهجين نتيجة لعدم اندماج نواتى الخليتين بالرغم من اندماج البروتوبلاست.
- ٣- يؤدى التهجين الجسمى بين خليتين ثنائية العدد الكروموسومى إلى تكوين خلايا ملتصقة Amphidiploid وليست مندمجة، وهى ظاهرة غير مستحبة.
- ٤- يظهر فى الأجيال التالية للتهجين الجسمى بين أنواع متباعدة فى المملكة النباتية بعض الشذوذ مثل غياب كروموسوم أو حدوث انقسامات شاذة Aneuploids أو غياب نواة من السيتوبلازم Cybrids.

إنتاج بروتوبلاست أحادى Haploid Protoplast

يتشابه بروتوبلاست خلايا طبقة الميزوفيل المفصول من نباتات أحادية مع بروتوبلاست النباتات الثنائية من حيث الانقسام فى البيئة الغذائية وإعطاء نباتات قادرة على التكاثر. كذلك يمكن فصل البروتوبلاست من جميع أجزاء النبات تقريبا، وأصبح الآن من الأعمال الروتينية بصرف النظر عن إن كان مصدره نباتات أحادية أو متضاعفة العدد الكروموسومى. وقد تميل خلايا البروتوبلاست الأحادى إلى التضاعف الكروموسومى بعد زراعتها فى المعمل، ولكن النباتات الناتجة من بروتوبلاست التبغ والبيتونيا والبطاطس والأترابا والداتورا تحتفظ بثباتها الوراثى وتظل أحادية العدد الكروموسومى. وقد ثبت أن زراعة بروتوبلاست خلايا الميزوفيل هى طريقة واعدة لإكثار النباتات الأحادية.

١- فصل البروتوبلاست من حبوب لقاح ناضجة

فى النباتات المزهرة Angiosperms، القشرة الخارجية Exine لحبة اللقاح الناضجة مغطاة بمادة Sporopollenin، معقد من بولييعيرات كاروتينية وإستر كاروتينات فى سلسلة مستقيمة غير متفرعة من مركب β -1,3 Glucan. وهى من أكثر المركبات العضوية صلابة ومقاومة لفعل المذيبات. ويمكن إذابتها فقط فى ايدروكسيد يوتاسيوم KOH ومحاليل مؤكسدة قوية وبعض القواعد العضوية الخاصة وبعض الكائنات الدقيقة، ولكن لم يثبت إمكان هضمها بالإنزيمات. ويتم فصل البروتوبلاست من حبوب لقاح ناضجة بإضعاف ثقب حبة اللقاح Germ pore وإحداث تحلل جزئى للقشرة الخارجية Exine لحبة اللقاح وإزالة القشرة بعد ذلك ميكانيكيا. ويستخلص البروتوبلاست الأولى Subpro-toplasts من أنبوبة حبة لقاح نابته. ويتميز البروتوبلاست المفصول حديثا بشكله الكروى Spherical واحتوائه على فجوة Vacuole. فإذا عرضت عشيرة من البروتوبلاست للطرد المركزى يندمج بطريقة ذاتية ويكون بروتوبلاست عملاقا متعدد الأنوية Multinucleate giant protoplasts. وبزراعة البروتوبلاست معمليا يحدث له استطالة ثم انقسام وتكوين براعم قادرة على النمو (Bajaj, 1975).

٢- فصل البروتوبلاست من حبوب لقاح غير ناضجة

نظرا لصعوبة فصل البروتوبلاست من حبوب اللقاح الناضجة فإنه يفضل استخلاصه من خلايا أمية لحبوب اللقاح Pollen mother cells وهى فى مرحلة مبكرة من النمو ويفضل أن تكون فى مرحلة الانقسام الرباعى Pollen tetrads، حيث تكون مغلفة بجدار بسيط غير معقد مثل القشرة الخارجية Exine لحبة اللقاح الناضجة. وخطوات فصل وزراعة البروتوبلاست من خلايا أمية لحبوب اللقاح وهى فى الطور الرباعى Tetrad قد حددها كالاتى:

١- يفصل متك واحد تحت ظروف معقمة من برعم زهرى حديث ثم يصبغ بصبغة Aceto-carmin للتأكد من مرحلة نمو حبوب اللقاح.

٢- تقطع نهاية قاعدة المتك بواسطة مشرط مدبب الطرف. ثم يضغط على المتك ضغطا خفيفا لإفراز محتواه إلى الخارج باستخدام ملعقة زجاجية Spatula. مع مراعاة أن الضغط الشديد نسبيا يؤدي إلى إخراج الخلايا ثنائية العدد الكروموسومي Diploid من المتك في صورة شريطية Tapetal cells. وتظهر محتوى الخلايا الأمية لحبوب اللقاح والخلايا الرباعية Tetrads في صورة محلول لبنى.

٣- يعامل البروتوبلاست المستخلص بخليط من إنزيم هليكييز Helicase تركيز ٠,٧٥ - ١٪ مضافا إليه ٨ - ١٠٪ سكروز (إنزيم هليكييز مستخلص من أمعاء قواقع Snail intestines)، وتحضن لمدة ٣٠ - ٤٥ دقيقة. ويستخدم خليط الإنزيم بمعدل واحد مليلتر لكل متك واحد فقط.

٤- بعد التحضين يتم إحلال خليط الأنزيم بمحلول ١٠٪ سكروز ويترك حتى يستقر البروتوبلاست.

٥- يشطف البروتوبلاست عدة مرات ببيئة سائلة طازجة، ثم يضاف البروتوبلاست إلى بيئة سائلة، ثم يزرع في المعمل، فتتكون جدر لبعض البروتوبلاست وتظهر عليه براعم. وقد يحدث انقسام أحيانا. وعادة تكون كمية البروتوبلاست المستخلص قليلة. لذلك لا يفضل إجراء الطرد المركزي حتى لا تنخفض كميته. وتلقى زراعة بروتوبلاست حبوب اللقاح قبولا فائرا لقلة ما ينتجه من نباتات أحادية.



الباب التاسع

المركبات الأيضية الثانوية فى النبات

أهمية المركبات الثانوية Secondary metabolites

هى مركبات ثانوية By-products تنتج فى النبات أثناء تمثيل المركبات الأيضية الأساسية التى لها أهميتها لنمو وتطور النبات مثل البروتينات والكربوهيدرات والدهون وغيرها . ومعظم المركبات الثانوية قد لا يكون لها أهمية فى نمو النبات وتطوره . وهى مركبات بسيطة أو متعددة ومختلفة فى تركيبها الكيميائى فمنها زيوت طيارة Volatile oil وقلويدات Alkaloids وتربينات Terpenoids وإسترويدات Steroids وأنثوسيانينات Anthocyanins وأنثراكوينونات Anthraquinones وفلافونات Flava-noids وجليكوزيدات Glycosides وفينولات Phenols ومركبات أليفاتية Aliphatic ومركبات أخرى كثيرة. وهذه المركبات محدودة الانتشار بين الأنواع النباتية. فقد يحتوى نوع أو جنس نباتى دون غيره على مركب محدد أو عدة مركبات تكسبه صفة التميز على غيره من النباتات. وقد ينحصر تواجد هذه المركبات فى عضو أو نسيج معين دون غيره مثل الورقة والزهرة والثمرة والقلف والبذرة وغيرها. وقد يظهر تركيزها فى مرحلة معينة من النمو. والمركبات الثانوية فى النبات لها أهمية كبيرة للإنسان فى المجالات الطبية والصناعية مثل صناعة الأدوية Drugs ومكسبات الطعم Flavors والعطور Perfumes والصبغات Pigments وغيرها. وهذه المركبات غالبا ثابتة التركيب لا تتغير ويصعب بناؤها داخل المعمل. وأهميتها للنبات غير معروفة حتى الآن. وقد تكون بعض هذه المركبات سامة وحامية للنبات ضد أعدائه الحيوية. ويستخلص الإنسان هذه المركبات لمقاومة الآفات. وتستخدم زراعة الأنسجة لاستخلاص كثير من المنتجات الثانوية من الأنسجة أو الأعضاء النباتية المنتجة والخازنة لها مباشرة من Endogenous. وتزرع الخلايا معلقة فى بيئة سائلة فى مخمرات كبيرة لأكثارها.

وتستخلص المركبات الثانوية على نطاق تجارى مباشرة من البيئة السائلة وتسمى Exogenous. ومنذ خمسينات القرن العشرين حدث تطور كبير فى إنتاج المخمرات والمعدات لاستخلاص المنتجات الثانوية من المزارع العملية بكفاءة عالية جدا. وتستخدم هذه الأجهزة فى استخلاص العديد من المنتجات الطيبة مثل استخلاص حمض Chlo- rogenic من نبات *Haplopappus* والفينولات Phenolics من نبات *Acer* والسربرنتين Serpentine من نبات *Catharanthus* والنيكوتين Nicotine من نبات *Nicotiana*.

مكسبات الطعم

١- المجموعة الأولى

هى مجموعة من مكسبات الطعم موجودة بصورتها النهائية فى خلايا النبات Endogenous ومنها:

(أ) مكسبات طعم بسيطة Simple flavours

مركبات كيميائية ترتبط بها مجموعة واحدة صغيرة تكسبها صفة مميزة مكسبة للطعم مثل الكابيسين Capsaicin فى الفلفل Capsicum و Gingerols فى الزنجبيل Zingiber.

ب- مكسبات طعم معقدة Complex flavours

مركبات مختلفة فى تركيبها ورتبتها الكيميائية. فقد تكون زيوتا عطرية طيارة أو مركبات ثابتة تنتشر فى ثمار الفاكهة والخضر. وتشترك المركبات الموجودة فى ثمرة معينة فى إظهار الطعم والرائحة المميز لها (Van Straten, 1977).

٢- المجموعة الثانية

مركبات كيميائية ليست مكسبة للطعم، توجد فى خلايا النبات فى صورة بواىء Precursors، تتحول إلى مركبات مكسبة للطعم أثناء المضغ أو التقطيع مثل

الثوم والبصل والكرنب حيث تتكون مركبات مكسبة للطعم نتيجة النشاط الإنزيمي على البوادى، الموجودة فى خلايا الثمرة. ففي البصل مثلا توجد مركبات S-methyl S-propyl ; S-trans-prop-1-enyl-L-cysteine sulfoxide ; مشتقة Derivatives من مركبات أخرى. وتعتبر بوادى، رئيسية غير طيارة. وخلال تمزق الخلية تتعرض هذه البوادى، لنشاط إنزيم Alliinase الذى يؤدى إلى إنتاج بوادى، سلفوأكسيد Sulphoxide precursors، وهذه بدورها تتحلل إنزيميا لتكون حمض سلفينيك Sulphenic acid مع الأمونيا Ammonia ومركب Pyruvate. ويدخل حمض السلفينيك فى سلسلة من التفاعلات الكيميائية ينتج عنها مركبات عديدة متطايرة تحتوى على الكبريت ومكسبة للطعم. كذلك توجد منتجات ثانوية أخرى مكسبة للطعم مشتقة من مركبات داخل الخلية غير مكسبة للطعم. ويمكن الحصول عليها أثناء عملية التخمير Fermentation أو عمليات أخرى، ومن أمثلة ذلك المركبات المكسبة لطعم الكاكاو Cocoa والفانيليا Vanilla التى تظهر أثناء معالجة Curing الثمار والطعم المميز للبن Coffee الذى يظهر أثناء التحميص.

نظم إنتاج المركبات الأيضية فى العمل

١-نظم الخلايا غير المتحركة Immobilized cell systems

وفيه تطمر الخلايا Embedded cells أو تصيد الخلايا Entrapped cells فى مادة جيلاتينية Gel أو فوم Foam، وتبقى ساكنة الحركة Immobilized وهى فى بيئة غذائية سائلة. وعند وصول الخلايا إلى ما بعد مرحلة أو مرحلتين من مراحل الثبات Stationary phase تستخلص المركبات الثانوية منها. والهدف من هذا النظام هو إنتاج مستمر أو نصف مستمر للمركبات الثانوية طبيعيا واستخلاصها بسهولة. ومن أمثلة ذلك استخلاص مادة الشيكونين Shikonin الحمراء تجاريا من نبات Lithospermum erythrorhizon. حيث تزرع خلايا النبات فى مخمر كبير Fermentor يحتوى على بيئة غذائية خاصة بزراعة وإكثار (Propagation medium) الخلايا

بكمية كبيرة. ثم تنقل الخلايا إلى مخمر آخر يحتوى على بيئة جديدة تسمى بيئة إنتاج (Production medium). وثبت نجاح هذه الطريقة فى إنتاج مادة الكابسين Capsaicin من خلايا ثمار الفلفل *Capsicum frutescens*، ومادة الأنثراكوينون An-thraquinones من نبات *Morinda citrifolia*، ومادة Tropane alkaloids من نبات الداتورا *Datura innoxia*.

٢- نظم التحولات البيولوجية Biotransformation System

استخدمت زراعة الأنسجة لإنتاج مركبات أيضية ثانوية فى الخمسينات من القرن العشرين. وتتميز هذه الطريقة بإنتاج مركبات تحت ظروف معملية منضبطة ومعقمة بنظام التحولات البيولوجية، حيث يضاف إلى البيئة الغذائية واحد أو أكثر من البوادئ الكيميائية، فيتم تحويله إلى منتج جديد أكثر قيمة، ويستلزم لذلك توفير بعض الإنزيمات بجانب المكونات الأساسية البسيطة للبيئة الغذائية مثل السكروز والعناصر الغذائية لتمثيل منتج أكثر تعقيدا. وقد يستلزم إضافة أو استبعاد أحد المجموعات الكيميائية من أحد المركبات من خلال عمليات حيوية مثل Hydroxylation و Glycosylation و Acetylation و Methylation ومن أمثلة ذلك:

- استخلاص مركب Digitoxin من خلايا نبات الديجيتاليس (Foxglove) *Digitalis lantana* المنزوعة فى بيئة سائلة. ثم تحويل مركب Digitoxin إلى مركب Digoxin المستخدم فى علاج أمراض القلب. وتتم هذه العملية بإضافة مجموعة هيدروكسيل لذرة الكربون رقم ١٢ وتسمى بعملية Hydroxylation.

- إنتاج قلويدات Alkaloids مثل Scopolamine بزراعة خلايا نباتات *Hyoscyamus niger*; *Atropa belladonna*.

- إنتاج مركبات Anthocyanins من خلايا نباتات الجزر *Daucus carota* *Catharanthus roseus*.

- إنتاج مركب Anthraquinones من نبات *Morinda citrifolia*.
- إنتاج صبغة الشيكونين الحمراء Red pigment shikonin من نبات *Lithospermum erythrorhizon*.
- إنتاج مادة الكابسيسين Capsaicin من خلايا ثمار الفلفل *Capsicum frutescens*.
- إنتاج مركب Tropan alkaloids من خلايا نبات الداتورا *Datura innoxia*.
- إنتاج مركب النيكوتين المستخدم كمبيد حشري من خلايا التبغ.
- إنتاج الفانيلين Vanillin من خلايا نبات الفانيليا بدلا من استخلاصها مباشرة من الثمار.

مواصفات الخلايا النباتية المستخدمة في إنتاج مركبات ثانوية

- تتميز بوجود تعبير جيني متجانس Homogenous ثابت وراثيا يؤدي إلى إنتاج مرتفع.
- تتميز الخلايا بسرعة النمو والانقسام والنضج لأن في ذلك زيادة إنتاج المركبات الثانوية.
- الخبرة المتميزة للباحث في فصل وانتخاب الخلايا أو النسيج المنتج للمركبات الثانوية بدقة وتعديل اتجاه دورة التفاعل في الوقت المناسب.
- الخبرة المتميزة للباحث في تحديد موعد جمع المركبات الأيضية الثانوية، حيث إنه مرتبط بمرحلة ما بعد الانقسام Post-division phase أثناء دورة نمو الخلايا في المعمل.

استخلاص بعض مكسبات الطعم في المعمل

ما زالت المعلومات المتوفرة حتى الآن عن مسار التفاعلات الكيميائية التي تؤدي إلى بناء كثير من المركبات الثانوية في النبات محدودة. وهذا يؤكد بالنسبة

لمسار انتفاعات الخاصة بالمركبات الوسطية التي تؤدي إلى تكوين مكسبات الطعم، خصوصا إذا كانت تنتج في خلايا أو عضو نباتي محدد من خلال تتابعات لبناء حيوي معبر عنه وراثيا، وهذا التعبير الوراثي مرتبط بفترة زمنية من السنة أو مرتبط بمرحلة معينة من نمو النبات. لذلك فمن المهم استخدام وسائل الهندسة الوراثية لنقل الجينات بهدف زيادة إنتاج مركبات اقتصادية محددة وخفض أو منع تكوين مركبات أخرى غير مرغوبة. ويجب أن تتميز الأجهزة الخاصة بزراعة الأنسجة بالكفاءة الذاتية لقياس سرعة نمو الخلايا والتحكم في سرعتها وإنتاج مركبات مستهدفة. كما يجب أن تكون الأجهزة مزودة بوسائل إيقاف التمثيل البنائي في الوقت المناسب وإجراء التجارب في أية فترة من السنة وتحقيق معدلا عاليا من الإنتاج. وتعتبر هذه النوعية من النظم وسائل جيدة لاستخلاص الإنزيمات والتعرف على المسار الكامل لتمثيل بعض المواد مثل مادة Berberine الموجودة في نبات Berberis ونبات Coptis. وأجريت دراسات عديدة على أنواع مختلفة من مزارع الأنسجة النباتية والكالس ومعلق الخلايا ومزارع الخلايا غير المتحركة لإنتاج مركبات مكسبة للطعم (Hong and Harlander, 1989). ومن أمثلة ذلك :

٩- الكابيسين Capsaicin

يستخرج الكابيسين من ثمار الفلفل التابعة للنوع *Capsicum frutescens* ويعرف تجاريا بالشطة الأفريقي African chilies وثمار النوع *Capsicum annum* ويعرف تجاريا بفلفل تاباسكو Tabasco. وتعرف هذه الشطة بأسماء تجارية أخرى مثل الشطة السوداني أو شطيطة أو فلفل أحمر. وتعتبر أمريكا الوسطى وأمريكا الجنوبية هي الموطن الأصلي لنبات الشطة. وتزرع بنجاح في الوطن العربي وخاصة السودان والثمار هي قرون صغيرة خضراء اللون في المرحلة الأولى من نموها ثم تتلون باللون الأحمر عند نضجها، وطعمها حريف جدا. والثمار الناضجة الحمراء الجافة هي المستعملة طبيا. وتحتوي ثمار الشطة على قلويد الكابيسين Capsaicin بنسبة

٠,٠٢٪ وهي المادة الحزيفة الرئيسية فى ثمار الفلفل. وكان إنتاج مادة الكابيسين منخفضا قبل تواجد المخمر الحيوى Biofermentor الذى كان سببا فى ارتفاع نسبة الاستخلاص إلى ١٠٠٪. وساعد على ذلك انتخاب سلالات من الفلفل تتميز بارتفاع محتواها من الكابيسين، واستخدام نظام معلق خلايا غير متحركة، وتوفير الظروف البيئية المحيطة المناسبة للاستخلاص. وتوضع الخلايا فى كيس شبكى من حبيبات بولى يوريثان قوم Reticulated Polyurethane Particles Foam. وبإضافة مركب Isocarpic acid - أحد البوادىء Precursors المنتجة للكابيسين مباشرة - إلى البيئة الغذائية السائلة تم الحصول على مزيد من الإنتاج. وكان أعلى معدل إنتاج هو ٥,٠ ملليجرام Capsaisin / جرام مادة جافة/ يوم. كما زاد إنتاجية هذه المزارع باستخدام مراقذ غير متحركة لخلايا الفلفل مصنوعة من جسيمات قوم ورقية Sta-tionary foam particles.

٢- الفانيلين Vanillin

نبات الفانيليا *Vanilla planifolia* معروفة بالفانيليا المكسيكى Mexican vanilla. وهى من نباتات المناطق الحارة. ويسمى فى المكسيك وجاميكا بالخروب العطرى. وتزرع الفانيليا للحصول على ثماره. وهى قرون رفيعة اسطوانية. طول القرن حوالى ٢٠ سم. القرون الخضراء يتحول لونها عند النضج إلى الأصفر، وبعد معالجتها Curing صناعيا تتحول إلى البنى القاتم. وتبدأ المعالجة بجمع القرون الخضراء مكتملة النمو وقبل اكتمال نضجها. ثم تجفف لتتكون بها مادة الفانيلين. وتحتوى القرون الخضراء على مواد جلوكوزيدية أهمها جلوكوفانيلين -Glucovanillin المعرفة باسم أفينين Avenin وكحول Glucovanillic alcohol. وأثناء المعالجة يتحلل الجلوكوفانيلين بفعل الإنزيمات إلى جلوكوز ومادة الفانيلين. ويتحلل Glucovanillic بفعل الإنزيمات إلى جلوكوز وكحول الفانيليك Vanillic، ويتحلل كحول الفانيليك بعد ذلك إلى مادة الفانيلين.

ومعالجة قرون الفانيليا خطوة هامة لاكتمال تكوين مادة الفانيلين Vanillin فيها وإعدادها للتسويق. وتختلف طرق المعالجة باختلاف منطقة زراعة الفانيليا. وتجرى المعالجة بإحدى الطرق الآتية:

١- تعرض الثمار للشمس حتى تجف، ثم تحفظ بعد تجفيفها بين طبقات من البطاطين الصوف، ثم تعرض للشمس عدة أيام حتى يتم معالجتها واكتمال لونها وتكوين مادة الفانيلين.

٢- تعرض الثمار لغاز الإيثيلين Ethylene في حجرات خاصة لفترة زمنية لمعالجتها وتكوين مادة الفانيلين.

٣- تغمس القرون لعدة ثوانٍ في ماء مغلي، وتكرر ٢-٣ مرات، ثم تجفف في أفران ثم تحفظ بين طبقات من بطاطين صوف داخل حجرات حتى تتم المعالجة وتكوين مادة الفانيليا. وهذه طريقة تعطى نتائج أفضل.

استخلاص مادة الفانيلين Vanillin

مادة الفانيلين المكسبة للطعم هي بللورات بيضاء لها رائحة وطعم قرون الفانيليا الجافة. وتخلق هذه المادة في خلايا القرن من بوادى جلوكوزيدية Glycosidic precursors فى وجود إنزيم B- glycosidase أثناء عملية المعالجة. وبالرغم من أن مركب الفانيلين Vanillin هو المكون الأساسى لمادة الفانيليا، إلا أن عملية التخمر تؤدى إلى إنتاج مركبات أخرى تتواجد بتركيزات مختلفة وتتميز بتفوقها العالى فى طعم ورائحة الفانيليا Vanilla الطبيعى نفسه. وقد أدخلت تحسينات فى مزارع معلق خلايا نبات الفانيليا للحصول على أعلى إنتاج لها وهو ٣٨٣ ميكروجرام/ لتر/ يوم، ويظهر المركب المنتج فى معلق الخلايا فى صورة فينول حر أكثر من أن يكون Glycoside. كذلك أدخل تطور آخر حيث أضيف للبيئة الغذائية الخاصة بأنسجة نبات الفانيليا بادى يسمى Ferulic acid يشجع إنتاج مادة الفانيلين. وأثبتت التجارب السابقة فى عدم تجمع مركبات فينولية مكسبة للطعم فى مزارع الخلايا

المعلقة لنيات الفانيليا مالم تظهر مع مركب Chitosan الذى يعمل على تجمع حمض الفانيليك Vanillic acid أكثر من الفانيلين Vanilin. وقد ثبت أن مركب Isoferulic acid هو البادى لحمض الفانيليك Vanillic acid. ونظرا لارتفاع سعر الفانيلين فقد أمكن تحضيرها من مصادر أخرى منها مادة كونيافرين Coniferin الموجودة فى جذوع بعض أنواع أشجار الصنوبر. وتحضر أيضا من اللجنين Legnin الموجود فى لب الخشب وهو ناتج ثانوى من صناعة الورق. كما يمكن تحضير مادة الفانيلين من مادة إجينول Eugenol وهى مادة فينولية موجودة فى زيت القرنفل.

٣ - المواد المكسبة للطعم فى البصل والثوم

يظهر الطعم المميز للبصل والثوم نتيجة تأثير إنزيم الأليينيز Alliinase على بواىء وسطية ناتجة من تحلل إنزيمى لمركب S- alkyl- cysteine sulfoxide. ولذلك يستلزم وجود هذا المركب مع إنزيم الأليينيز فى مزارع الخلايا للحصول على أفضل النتائج. ومن خلال مزارع الخلايا المعلقة للبصل أمكن تنشيط الخلايا بتغذيتها على بواىء مكسبات الطعم وفى وجود إنزيم الأليينيز فى البيئة الغذائية. وثبت بالتجربة أن مركب ^{14}C -labelled S- (2- carboxypropyl)- L- Cysteine هو البادى لمركب S- trans prop- 1-enyl- L- cysteine ، والمركب الأخير هو بواىء أيضا. ومضمون هذه التجربة أن مسارات التفاعل المذكورة يتم التعبير عنها حتى فى الزراعات المعملية غير القادرة للوصول إلى الطعم النهائى المميز للبصل. وثبت أن المستويات المنخفضة (٥,٠ ملليجرام/ لتن) من منظم النمو Picloram فى البيئة الغذائية لنمو كالس البصل أدى إلى تنشيط تراكم المركب S- trans prop- 1-enyl- L- cysteine sulfoxide إلى مستوى ٤٠٪ من التركيز الموجود فى البصل. وهذه المزروعات الخلوية لها القدرة على إنتاج مركبات مميزة لطعم البصل لأن لها القدرة على تكوين كل البواىء الأساسية له (Musker, et al. 1988). كذلك ثبت أن المستويات المنخفضة من منظم النمو Picloram فى البيئة الغذائية تنشط تكوين

الجنذور ونمو البراعم الخاصة بالنموات الخضرية، بينما المستويات المرتفعة من هذا الهرمون تؤدي إلى تكوين باديء السلفوكسيد Sulphoxide precursor بدون حدوث تكشقات للبراعم والجنذور. وعلى ذلك فليس من الضروري الربط بين العمليتين (Col- lin et al. 1989).

٤ - زيت النعناع Mint essential oil

مزارع الكالس لخلايا النعناع *Mentha piperita* عادة منخفضة في إنتاجيتها من زيت النعناع. وهو زيت ترتفع فيه نسبة كل من مادتي Menthofuran; Pulegone بالمقارنة بنبات الأم الذي يحتوى على نسبة مرتفعة من الزيت الكلى الذى يسود فيه مادتا Menthone; Menthol. كذلك ثبت وجود تربينات أحادية Monoterpenes فى مزارع السلالات الخلوية Cell lines للنعناع بنسب صغيرة ووحيدة ضمن مكونات الزيت الطيار بالإضافة إلى كميات شحيحة من مركبات Neomenthol; Menthone; Neomenthyl acetate. ولا توجد خلايا تحتوى على Menthol. ويعزى عدم تجمع التربينات الأحادية فى خلايا النعناع إلى سرعة تحليلها أكثر من بنائها فى الخلية لأنها مركبات سامة Phyto-toxic متجمعة ومعزولة خارج الخلايا فى مكان بين جدار الخلية وكيوتيكل الخلايا المفروزة للغدد الزيتية. وفى زراعة الأنسجة لا يوجد فاصل فيزيقي بين بناء وتخزين التربينات الأحادية ولا توجد وسائل تحمي التربينات من التحلل المباشر وهى فى بداية نشأتها. كما ثبت أن زراعة الخلايا على بيئة غذائية ثنائية المظهر Two phase systems مفيدة فى تشجيع تراكم التربينات من بعض الأنواع النباتية. وأن المركبات المحبة للدهون Lipophilic مثل الجليسيريدات الثلاثية ومنها مركب Myglyol مفيدة لادمصاص وتنظيم التربينات الأحادية المفروزة فى البيئة الغذائية للخلايا. ويمكن القول بأن وجود مركبات الادمصاص غير القطبية Non-polar adsorbents له أهميتها لتتبع تراكم التربينات الأحادية. وبالرغم من النجاح المحدود فى مزارع خلايا كالس النعناع غير المتكشف، إلا أن كالس نوع النعناع *M. piperita* المتكشف أعطى نموات خضرية وأنتج كميات معنوية من التربينات الأحادية الطبيعية.

٥ - مكسبات طعم الفاكهة Fruit flavours

توجد مركبات معقدة مكسبة لطعم الفاكهة أهمها مكسبات طعم الفراولة والموانح. ويستخدم مكسب طعم الفراولة على نطاق واسع في الصناعات الغذائية. وحدث تطور محدود في زراعة الأنسجة للحصول على طعم الفراولة (Hong, and Har-lander, 1989). ويشترك حوالى ٢٠٠ مركب في إظهار طعم الفراولة منها إسترات Esters وكيثونات Ketones وكحولات Alcohols وأحماض عضوية Organic acids ولاكتونات Lactoes والفيورانات Furans. ومكسبات طعم الجوافة من المركبات الهامة والمعقدة. وفي دراسة تحليلية لكالس ناتج من خلايا ثمار الجوافة استخدم فيها جهاز Gas chromatography (GC) تم التعرف إلى ١٩ مركبا متطائرا من ٥٨ مركبا موجودة أصلا في ثمار الجوافة.



الباب العاشر

ملاحق Appendixes

١- بيئات غذائية Media

الرمز الاختزالي للبيئة	الرجع
A	Anderson (1978)
B5	Gamborg et al. (1968)
ER	Erikkson (1965)
KC	Knudson C medium (1922)
KCBP	Knudson C medium + B + P (1946)
KCS	Knudson C medium + CW + S (1946)
LS	Linsmaier and Skoog, 1965
MS	Murashige and Skoog (1962)
MT	Murashige and Tucker (1969)
NN	Nitsch and Nitsch (1969)
SH	Schenk and Hildebrandt (1972)
VWN	Vacin and Went medium (1949)
VWS	Vacin and Went medium + S + CW

تابع (١- بيئات غذائية)

الرمز الاختزالي للبيئة	المراجع
Tch	Vacin and Went medium + AC + T
VWM	Vacin and Went medium + B + CW + T
WH	White's medium (1963)
WPM	Woody Plant Media

٢- منظمات نمو Growth regulators

الرمز الاختزالي	المركب
ABA	Absciscic acid
ALAR	Succinic acid 2,2- methyl- hydrazide.
AZI	7- Aza- Indole.
BA	6- Benzyl Adenine
6BAP	6- Benzyl Amino Purine.
BTAA	2- Benzo Thiazole Acetic Acid.
BUDR	5- bromodeoxyuridine
CCA	Cellulose Crystallite Aggregate.
CCC	Chlormequat- 2 Chloroethyl trimethyl ammonium Chloride.

تابع (٢- منظّمات نمو Growth regulators)

الرمز الاختزالي	المركب
CPA	(4- Chlorophenoxy) acetic acid.
2,4- D	(2,4- Dichlorophenoxy) acetic acid.
DCMU	3- (3,4- Dichlorophenyl- 1,1- Dimethyl Urea.
DPU	Phenylurea and its derivatives.
HNB	5- Hydroxy Nitro Benzyl- bromide.
IAA	Indole- 3- Acetic Acid.
IBA	Indole- 3- Butyric Acid.
2iP	6- y- y- Dimethyl ally Amino Purine
IPA	(2- Isopentenyl) adenine.
GA3	Gibberellic Acid, (Gibberellin A3).
KIN	Forfuryl- Amino Purine (Kinetin).
NAA	1- Naphthalene Acetic Acid.
NOA	2- Naphthoxy Acetic acid.
PIC	Picloram (4- amino- 3,5,6- trichloropicolinic acid).
PBA	{6- (Benzylamino)- 9- (2- Tetrahydropyranyl)- 9H- purine}.
2,4,5- T	(2,4, 5- Trichlorophenoxy) acetic acid.

تابع (٢- منظمات نمو Growth regulators)

الرمز الاختزالي	المركب
TCP or (Pichloram)	4- Amino- 3,5,6- Trichloropicotinic Acid.
TIBA	2, 3, 5- Triiodobenzoic acid.
WPM	Woody Plant Media.
ZEA	.5- (4- Hydroxy- 3- Methyl- triene-2- Butenylamine) Pu- rine (Zeatin = Riboside)

٣- إضافات Additives

الرمز الاختزالي	المركب
AC	Active charcoal.
ACP	Acid phosphatase
AdS	Adenine Sulfat
ADE	Adenine.
ALAR	Succinic acid 2,2- methyl- hydrazide
ALK	Alkaline phosphatase
Arg	Arginine
As	Ascorbic acid

تابع (٣- إضافات Additives)

الرمز الاختزالي	المركب
Asp	Asparagine
AZI	7 Aza~ Indole
Bio	Biotin
Ca	DL- Catechin
CaP	Ca pantothenate
CAT	Catalase.
CCC	2 Chloro- ethytriethyl ammonium chloride
Cg	Chlorogenic acid
CH	Casein hydrolysate (edamin).
Ch	Choline chloride
Cm	Corn milk
CW (CM)	Coconut water (Coconut milk).
Cys	Cysteine.
DIECA	Diethyl- dithio carbonate
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DPU	Phenylurea and its Derivatives
EDTA	Ethylene- Diamin- Tetra Acetic acid.

تابع (٣- إضافات Additives)

الرمز الاختزالي	المركب
EMS	Ethyl Methane Sulphonate
EST	Esterase
FAP	Furfural Amino Purine
Fol	Folic acid
Glu	Glutamine.
LH	Lactalbumin hydrosate
ME	Malt extract.
NHB	5- Hydroxy Nitro Benzyl – bromide
PEG	Polyethylene glycol
PEP	Para fluorophenyl alanine
PHG	Phloroglucimol
PPO	Polyphenol oxidase
PPU	Pyridyl-Phenyl Urea
PRX	Peroxidase.
S	Sugar
SOD	Superoxidas dismutase.

مراجع

- مراجع باللغة العربية:

- شرباش- محمود توفيق محمد ١٩٩٥. تكنولوجيا الإشعاع فى الأغذية والزراعة. إصدار المنظمة العربية للتنمية الزراعية والهيئة العربية للطاقة الذرية.
- مراجع باللغة الإنجليزية:

- Amina, A. A. 2000. Ph. D. Thesis, Dept. of Biochemistry, Fac. of Agric., Cairo Univ.
- Anonymous, 1978. Plant tissue culture. Pitman, Boston: 769- 773.
- Asmahan, A. Mahmoud (2000). J. Agric. Sci. Mansoura Univ., 25 (10): 6167- 6165.
- Bajaj. Y. P. S. 1975. Protoplast culture and production of haploids. In: From, Structure and Function in Plant, p. 107- 113. Sarita Prakashan Press, Meerut, India.
- Bajaj. Y. P. S. 1977. In: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissuc and Organ Culture, (Reinert and Bajaj, eds.), PP. 468- 96. Springer-Verlag, Berlin.
- Bajaj. Y. P. S. 1979b. Technology and prospects of cryopreservation of germplasm Euphytica, 28: 267- 285.
- Bajaj. Y. P. S. 1981a. Plant genetic conservation through tissue culture. Proc. Intern. Workshop Improvment of Tropical Crops Through Tissue Culture, Dacca Univ., Dacca, Bangladesh, 44- 46.
- Collin, H. A. Musker, D. and Britton, G. 1989. in "Primary and secondary Metabolism of Plant Cell Cultures" II ed. W. G. W. Kurz. Springer- Verlag. Berlin. p. 125.
- De Langhe, E. and De Bruijne, E. 1976. Continuous propagation of tomato plant by means of callus culture. Sci. Hortic. 4: 221- 227.
- George, E. F., 1993. in: plant Propagation by Tissue culture- part 1: The technology Edington; Exegetics, vol. 1.

- He, D. G. and Ouyang, J. W., 1980. In: Annual Report of the Instit. of Genetics, Academia Sinica, 1979, p. 74.
- Hoda, E, M. 2000. ph. D. Thesis, Dept. of Genetics, Fac. of Agric., Ain Shams Univ.
- Hong, Y. C. and Harlander, S. K. 1989. in "Flavor Chemistry of Lipid Food. (ed. D. B. Min and T. H. Smouse), AOCS. Champaign, Illinois, p. 348.
- Horgan, 1986. Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr. 6: 295.
- Institute of tobacco, breeding group, Shantung Province, and Institute of Botany Academia Sinica. 1974a. Acta Bot. Sin. 16: 301- 303.
- Iwai and Kishi, 1986. Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr., 6: 82.
- Lloyd and Mc Cown, 1980. Comb. Proc. Int. Plant Tissue and Cell Culture, Leicester: 46.
- Maliga, P., Breznovites, A. S. and Morton, L. 1973. Streptomycin- resistant Plants from callus culture of haploid tobacco. Nature New Biol. 244: 29.
- Meyer and Kernsh. 1986. Int. Congr. plant Tissue Cell Culture Abstr., 6: 149.
- Morel. G. 1960. Am. Orchid Soc. Bull. 29: 495- 497.
- Morel, 1964. Rev. Hort. Ann. Soc. Nat. Hort., France, 136: 733- 740.
- Mori et al. 1982. Proc. 5th Cong. Plant Tissue Cell Culture. 5: 803- 904.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. Physiol. Plant. 15: 473- 97.
- Murashige, T. and Tucker, D. P. H. 1969. Proc. 1st. Int. Citrue Symp. (3): 1155- 1161. (c. f. Amer. Soc. Hort. Sci., 1205 (6): 902- 905.
- Musker, D., Collin, H. A., Britton, G. and Ollerhead, G. 1988. in "Manipulating Secondary Metabolism in Cultures." Cambridge Univ. Press. Cambridge. P. 177.
- Nitsch, C. 1977. In: Applied and fundamental aspects of Plant cell, tissue and organ Culture (Reinert and Bajaj Eds), p. 268- 278. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, N. Y.
- Nitsch, J. P. and Nitsch, C 1969. Haploid Plants from pollen grains. Science 163: 85- 87.

- Noha, E. R. H. E. 2001. M. Sc. Botany (Physiology) Dept. Fac. of Girls for Arts, Science and Education, Ain Shams Univ. Cairo, Egypt.
- Pierik, R. L. M, 1997. In vitro cultures of higher Plants. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers.
- Sadik, A. S. 1994. Studies on viruses affecting banana in Egypt. Ph. d. Thesis, Dept. of Agric. Microbiology, Fac. Agric., Ain Shams Univ., Cairo, Egypt.
- Sharabash, M. T. M. (1977). 1. Effects on retention of ^{14}C in the leaf. Egypt. J. Bot. 20 (1), pp. 49- 57.
- Sharabash, M. T. M. 1980. Translocation patterns of ^{14}C in *Vicia faba* plants, arising from $^{14}\text{CO}_2$ assimilates, as influenced by three $^{12}\text{CO}_2$ levels. Egypt. J. Bot. 23 (2), pp. 89- 98.
- Sharabash, M. T. M. (1981a). Effect of CO_2 concentration on retention and distribution pattern of radiocarbon in *Vicia faba* Plant. Egypt. J. Physiol. 8 (2) pp. 169- 176,
- Sharabash, M. T. M. (1981b). II. Effects on distribution pattern of ^{14}C assimilation. Egypt. J. Physiol. 8 (2), pp. 177- 185.
- Sharabash, M. T. M. 1997. in- vitro techniques for selecting radiation-induced mutants adapted to adverse environmental conditions. FAO/ IAED, Jul., 1997, Doc. 85: 55- 58.
- Sharp, W. R., Raskin, R. S., and Sommer, H. E., 1972. The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato. Planta 104: 357- 361.
- Skoog and Miller, 1975. Symp. Soc. Exp. Biol. No. 11, The biological action of growth substances, p: 118- 131.
- Skoog and Tsui, 1948. Am. J. Bot. 35: 782- 787.
- Van Aartrijk, J. and Van derLinde, P. C. G. 1986. in- vitro propagation of flower bulb crops. In: Tissue culture as a Plant Production system for horticultural crops. (R. H).
- Van Straten, S. 1977. in "Volatile compound in food." 4th Edn., Central Institute for Nutrition and Food Research. Zeist, Netherlands.

- Wang, Y. Y., Sun, Wang, C. S., and Chien, N. F. 1973. The induction of the pollen plantlets of Triticale and capsicum annuum from anther culture. Sci. Sin. 16: 147- 151.
- Wenzel, G. and Uhrig, H. 1981. Breeding methods and virus resistance in potato via anther culture, Theor. Appl. Genet. 59: 333- 340.
- White, 1934a. Plant Physiol. 9: 585- 600.
- White, P. R. 1963. The cultivation of Animal and Plant cells, 2nd. Ronald Press, N. Y.
- Yin, K. C., Hsu, C., Chu, C. Y., F. Y., Wang, S. T., Liu, T. Y., Chu, C. C., Wang, C. C. and Sun, C. 1976. A study of the new cultuvar of rice raised by haploid breeding method. Sci. Sinica, 19: 227- 242.
- Zhou, C. and Yang, H. Y. 1980. Anther culture and androgenesis of Hordeum vulgare L. Acta Genet. Sin. 7: 287.

